

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

Veröffentlichungsnummer: **0 590 530 A2**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 93115418.1

(22) Anmeldetag: 24.09.93

(51)

Int. Cl.⁵: **C12N 15/62**, C07K 15/28,
C12N 9/00, C12N 15/81,
A01K 67/027, A61K 37/02,
G01N 33/68, C12N 1/21,
C12N 5/10

(30)

Priorität: 02.10.92 DE 4233152

(43)

Veröffentlichungstag der Anmeldung:
06.04.94 Patentblatt 94/14

(84)

Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL
PT SE

(71)

Anmelder: **BEHRINGWERKE**
Aktiengesellschaft
Postfach 1140
D-35001 Marburg(DE)

(72)

Erfinder: **Gehrmann, Mathias**
Wingertstrasse 11
D-35457 Lollar(DE)
Erfinder: **Seemann, Gerhard**
Weissdornweg 32
D-35041 Marburg(DE)
Erfinder: **Bosslet, Klaus**
An der Haustatt 64
D-35037 Marburg(DE)
Erfinder: **Czech, Jörg**
Höhenweg 3
D-35041 Marburg(DE)

(54)

Fusionsproteine zur Prodrug-Aktivierung.

(57)

Die Erfindung betrifft Verbindungen, die eine Antigenbinderegion enthalten, welche an mindestens ein Enzym gebunden ist, das eine nicht oder wenig zytotoxische Verbindung (Prodrug) in eine zytotoxische Verbindung (Drug) metabolisieren kann, wobei die Antigenbinderegion aus einer einzigen Polypeptidkette besteht. Vorteilhafterweise befinden sich an der Polypeptidkette kovalent gebundene Kohlenhydrate.

EP 0 590 530 A2

19853
#11

Die Erfindung betrifft Verbindungen, die eine Antigenbinderegion enthalten, welche an mindestens ein Enzym gebunden ist, das eine nicht oder wenig zytotoxische Verbindung (Prodrug) in eine zytotoxische Verbindung (Drug) metabolisieren kann, wobei die Antigenbinderegion aus einer einzigen Polypeptidkette besteht. Vorteilhafterweise befinden sich an der Polypeptidkette kovalent gebundene Kohlenhydrate.

- 5 Die Kombination von Prodrug und Antikörper-Enzym-Konjugaten zur Anwendung als therapeutisches Mittel ist in der Fachliteratur bereits beschrieben. Hierbei werden gegen ein bestimmtes Gewebe gerichtete Antikörper, an die ein Prodrug-spaltendes Enzym gebunden ist, einem Organismus injiziert, und anschließend wird eine enzym-aktivierbare Prodrug-Verbindung verabreicht. Unter der Einwirkung des am Zielgewebe gebundenen Antikörper-Enzym-Konjugates soll die Prodrug-Verbindung in eine Verbindung umgewandelt werden, die eine zytotoxische Wirkung gegen das gebundene Gewebe ausübt. Allerdings hat sich bei
- 10 Arbeiten mit Antikörper-Enzym-Konjugaten gezeigt, daß diese chemischen Konjugate eine ungünstige Pharmakokinetik besitzen, so daß eine ortsspezifische tumorselektive Spaltung der Prodrug nur unzureichend erfolgt. Manche Autoren haben versucht, diesen offensichtlichen Mangel durch zusätzliche Injektion eines anti-Enzymantikörpers, der eine schnelle Eliminierung des Antikörperenzymkonjugates aus dem
- 15 Plasma bewirken soll, zu beheben (Sharma et al., Brit. J. Cancer, 61, 659, 1990). Ein weiteres Problem von Antikörperenzymkonjugaten ist die begrenzte Möglichkeit, große Mengen reproduzierbar und homogen herzustellen.

- Aufgabe der vorliegenden Erfindung war nun, Fusionsproteine zu finden, die in großtechnischem Maßstab hergestellt werden können und aufgrund ihrer pharmakokinetischen und pharmakodynamischen
- 20 Eigenschaften für therapeutische Anwendungen geeignet sind.

Es wurde dabei gefunden, daß Verbindungen, die eine Antigenbinderegion enthalten, welche aus einer einzigen Polypeptidkette besteht, für die Herstellung und Verwendung von Fusionsproteinen, welche vorteilhaft mit Kohlenhydraten besetzt sind, bei der Prodrug-Aktivierung unervartete Vorteile besitzen.

- Gegenstand der Erfindung sind daher Verbindungen, die eine Antigenbinderegion enthalten, welche an
- 25 mindestens ein Enzym gebunden ist, wobei die Antigenbinderegion aus einer einzigen Polypeptidkette besteht und das Fusionsprotein vorteilhaft mit Kohlenhydraten besetzt ist.

- Unter Antigenbinderegion versteht man im Sinne der Erfindung eine Region, die mindestens zwei variable Domänen eines Antikörpers enthält, vorzugsweise eine variable Domäne einer schweren Antikörperkette und eine variable Domäne einer leichten Antikörperkette (sFv-Fragment). Die Antigenbinderegion
- 30 kann jedoch auch bi- oder multivalent aufgebaut sein, d.h. zwei oder mehr Binderegionen besitzen, wie beispielsweise in der EP-A-0 404 097 offenbart. Besonders bevorzugt ist jedoch ein humanes oder humanisiertes sFv-Fragment, insbesondere ein humanisiertes sFv-Fragment.

Vorzugsweise bindet die Antigenbinderegion an ein tumorassoziiertes Antigen (TAA), wobei insbesondere folgende TAAs bevorzugt sind:

- 35 neural cell adhesion molecule (N-CAM),
polymorphic epithelial mucin (PEM),
epidermal growth factor receptor (EGF-R),
Thomsen Friedenreich antigen 8 (TF8),
gastrointestinal tract carcinoma antigen (GICA),
- 40 ganglioside GD₃ (GD₃),
ganglioside GD₂ (GD₂),
Sialyl-Le^a, Sialyl-Le^x,
TAG72,
das durch MAK L6 definierte Glykoprotein mit 24-25 kDa,
- 45 CA 125 und vor allem das
carcinoembryonic antigen (CEA).

- Als Enzyme sind diejenigen Enzyme bevorzugt, die eine nicht oder wenig zytotoxische Verbindung in eine zytotoxische Verbindung metabolisieren können. Beispiele sind die β -Lactamase, Pyroglutamat-Aminopeptidase, Galactosidase oder D-Aminopeptidase wie z.B. in der EP-A2-0 382 411 oder EP-A2-0 392
- 50 745 beschrieben, eine Oxidase wie z.B. Ethanoloxidase, Galactoseoxidase, D-Aminosäureoxidase oder α -Glyceril-Phosphatoxidase, wie z.B. in der WO 91/00108 beschrieben, eine Peroxidase gemäß z.B. EP-A2-0 361 908, eine Phosphatase, wie z.B. in EP-A1-0 302 473 beschrieben, eine Hydroxynitrilase oder Glucosidase gemäß z.B. WO 91/11201, eine Carboxypeptidase, wie z.B. die Carboxypeptidase G2 (WO 88/07378), eine Amidase, wie z.B. die Penicillin-5-amidase (Kerr, D. E. et al. Cancer Immunol. Immunther.
- 55 1990, 31), eine Protease, Esterase oder Glycosidase, wie die bereits erwähnte Galactosidase, Glucosidase oder eine Glucuronidase, wie z.B. in der WO 91/08770 beschrieben. Bevorzugt ist eine β -Glucuronidase, vorzugsweise aus *Kobayasia nipponica* oder *Secale cereale* und besonders bevorzugt aus *E. coli* oder eine humane β -Glucuronidase. Die Substrate der einzelnen Enzyme sind in den genannten Schutzrechten

mit angegeben und sollen auch zum Offenbarungsgehalt der vorliegenden Anmeldung gehören. Bevorzugte Substrate der β -Glucuronidase sind N-(D-Glycopyranosyl)-benzyloxycarbonyl-anthracycline und insbesondere das N-(4-Hydroxy-3-nitro-benzyloxycarbonyl)-doxorubicin bzw. daunorubicin- β -D-glucuronid (J. C. Florent et al. (1992) Int. Carbohydr. Symp. Paris, A262, 297 oder S. Andrianomenjanahary et al. (1992) Int. Carbohydr. Symp. Paris, A 264, 299).

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Nukleinsäuren, die für die erfindungsgemäßen Verbindungen kodieren. Insbesondere bevorzugt ist eine Nukleinsäure sowie deren Varianten und Mutanten, die für ein humanisiertes sFv-Fragment gegen CEA (Carcinoembryonales Antigen) verbunden mit einer humanen β -Glucuronidase kodiert (sFv-hu β -Gluc), vorzugsweise mit der in Tabelle 1 angegebenen Sequenz.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen erfolgt im allgemeinen gentechnisch, nach dem Fachmann allgemein bekannten Verfahren, wobei die Antigenbinderegion mit einem oder mehreren Enzymen entweder direkt oder über einen Linker, vorzugsweise einem Peptidlinker, verbunden sein kann. Als Peptidlinker kann beispielsweise eine "Hinge-Region" eines Antikörpers oder eine "hinge"-ähnliche Aminosäuresequenz verwendet werden. Das Enzym ist dabei vorzugsweise mit dem N-Terminus an die Antigenbinderegion direkt oder über einen Peptidlinker verbunden. Das oder die Enzyme können jedoch auch chemisch, wie z.B. in der WO 91/00108 offenbart, mit der Antigenbinderegion verbunden werden.

Die für die Aminosäuresequenz der erfindungsgemäßen Verbindungen kodierende Nukleinsäure, wird im allgemeinen in einem Expressionsvektor kloniert, in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen, wie z.B. BHK- CHO-, COS-, HeLa-, Insekten-, Tabakpflanzen-, Hefe- oder *E.coli*-Zellen eingebracht und exprimiert. Die so hergestellte Verbindung kann anschließend isoliert und als Diagnostikum oder Therapeutikum verwendet werden. Ein weiteres allgemein bekanntes Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindung ist die Expression der dafür kodierenden Nukleinsäuren in transgenen Säugern mit Ausnahme von Mensch, vorzugsweise in einer transgenen Ziege.

Mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren transfizierte BHK-Zellen exprimierten ein Fusionsprotein (sFv-hu β -Gluc), welches sowohl spezifisch für CEA war als auch volle β -Glucuronidase Aktivität besitzt (siehe Bsp. 5).

Dieses Fusionsprotein wurde über Anti-idiotyp Affinitätschromatographie entsprechend der in EP O 501 215 A2 (Beispiel M) beschriebenen Methode gereinigt. Das so gereinigte Fusionsprotein besitzt unter reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE ein Molekulargewicht von 100 kDa, unter nichtreduzierenden Bedingungen treten Moleküle von 100 bzw. 200 kDa auf.

Gelchromatographie unter nativen Bedingungen (TSK-3000 Gel-chromatographie) zeigte einen Protein-Peak (Bsp. 6, Abb. I), der mit dem Aktivitätspeak im Spezifitätsenzymaktivitätstest (EP O 501 215 A2) korreliert. Die Position des Peaks im Vergleich zu Standard-Molekulargewichtsmarkern deutet auf ein Molekulargewicht von \approx 200 kDa hin. Dieser Befund, verbunden mit den Daten aus der SDS-PAGE, suggeriert, daß das funktionelle, enzymatisch aktive sFv-hu β -Gluc Fusionsprotein als "bivalentes Molekül", d.h. mit 2 Binderegionen und 2 Enzymmolekülen, vorliegt. Hier nicht beschriebene Versuche deuten darauf hin, daß das Fusionsprotein unter bestimmten Kultivierungsbedingungen auch als Tetramer, mit 4 Binderegionen und 4 Enzymmolekülen, vorliegen kann. Nachdem das sFv-hu β -Gluc Fusionsprotein gereinigt und in vitro funktionell charakterisiert war, wurde die Pharmakokinetik und die Tumorlokalisation des Fusionsproteins in nackten Mäusen bestimmt, die mit menschlichen Magenkarzinomen bestückt waren. Die Mengen an funktionell aktivem Fusionsprotein wurden in den Organen sowie dem Tumor zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach adäquater Aufarbeitung der Organe (Beispiel 7) sowie immunologischer Bestimmung (Triple-Determinanten-Test, Beispiel 8) bestimmt. Die Ergebnisse eines repräsentativen Versuches sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Erstaunlicherweise wird bereits nach 48 Stunden ein Tumor/Plasma Verhältnis von 5/1 erreicht. Zu späteren Zeitpunkten wird dieses Verhältnis noch günstiger und erreicht Werte $> 200/1$ (Tag 5). Die Ursache für dieses günstige pharmakokinetische Verhalten des sFv-hu β -Gluc Fusionsproteins liegt darin, daß nicht am Tumor gebundenes Fusionsprotein hauptsächlich über Rezeptoren für Mannose-6-Phosphat und Galaktose aus dem Plasma und den Normalgeweben durch Internalisation entfernt wird. (Diese Aussage läßt sich dadurch belegen, daß die β -Glucuronidase Werte intrazellulär, z.B. in der Leber, ansteigen).

Wie in Tabelle 5 gezeigt, enthält das sFv-hu β -Gluc größere Mengen an Galaktose und vor allem Mannose, die hauptsächlich für die Anbindung an die jeweiligen Rezeptoren verantwortlich sind. Der so entstandene, über die Kohlenhydratreste des Fusionsproteins gebundene Fusionsprotein-Rezeptorkomplex wird dann durch Internalisation aus dem extrazellulären Kompartiment entfernt.

Dieser hauptsächlich über Galaktose und Mannose vermittelte schnelle Internalisationsmechanismus ist maßgeblich an der vorteilhaften Pharmakokinetik des erfindungsgemäßen Fusionsproteins beteiligt. Diese vorteilhafte Pharmakokinetik des mit Galaktose und vor allem Mannose besetzten Fusionsproteins ermög-

licht die i.v. Applikation einer sich extrazellulär verteilenden, hydrophilen Prodrug zu einem relativ frühen Zeitpunkt, ohne eine unspezifische Prodrugaktivierung hervorzurufen. Hierbei ist ein Eliminierungsschritt wie bei Sharma et al. (Brit. J. Cancer, 61, 659, 1990) beschrieben, nicht nötig. Basierend auf den Daten der Tabelle 4 ist die Injektion einer geeigneten Prodrug (S. Adrianomenjanahari et al. 1992, Int. Carbohydrate Symp., Parts A264, 299) schon 3 Tage nach Injektion des sFv-hu β -Gluc Fusionsproteins ohne Erzeugung von signifikanten Nebenwirkungen möglich (Daten nicht gezeigt).

Ein ähnlich vorteilhafter Kohlenhydratbesatz auf Fusionsproteinen ist z.B. auch durch sekretorische Expression des sFv-hu β -Gluc Fusionsprotein in bestimmten Hefestämmen wie *Saccharomyces cerevisiae* oder *Hansenula polymorpha* zu erzielen. Diese Organismen sind in der Lage, Fusionsproteine, die entsprechende N-Glykosylierungsstellen besitzen, sehr wirkungsvoll zu mannosylieren (Goochee et al., Biotechnology, 9, 1347-1354, 1991). Solche sekretorisch in Hefezellen exprimierten Fusionsproteine zeigen einen hohen Mannosylierungsgrad und eine dem in BHK-Zellen exprimierten sFv-hu β -Gluc Fusionsprotein vergleichbare günstige Pharmakokinetik (Daten nicht gezeigt). Hierbei wird die Abwesenheit von Galaktose durch den noch höheren Mannosylierungsgrad des Fusionsproteins ausgeglichen (Tabelle 6). Das oben beschriebene sFv-hu β -Gluc Fusionsprotein wurde, wie in Beispiel 9 näher beschrieben, gentechnisch konstruiert und in Hefe exprimiert.

Anstelle der humanen β -Glucuronidase kann man jedoch auch eine andere Glucuronidase mit vorteilhaften Eigenschaften einsetzen. Beispielsweise hat die *E.coli* β -Glucuronidase insbesondere den Vorteil, daß ihre katalytische Aktivität bei pH 7.4 signifikant höher ist als die der humanen β -Glucuronidase. In Beispiel 10 wurde mittels gentechnischer Methoden ein sFv-E. coli β -Gluc Konstrukt hergestellt und in *Saccharomyces cerevisiae* sekretorisch als funktionell aktives mannosyliertes Fusionsprotein exprimiert. Die pharmakokinetischen Daten sind denen des sFv-hu β -Gluc Moleküls, welches in Hefe bzw. in BHK-zellen exprimiert wurde (Tabelle 4), vergleichbar.

Die Glucuronidasen aus dem Pilz *Kobayasia nipponica* und aus der Pflanze *Secale cereale* haben z.B. den Vorteil, daß sie auch als Monomere aktiv sind. In Beispiel 11 ist mittels gentechnischer Methoden ein Konstrukt hergestellt worden, welches nach Expression in *Saccharomyces cerevisiae* ein sFv-B. cereus β -lactamase II Fusionsprotein in vorzugsweise mannosylierter Form ausscheidet.

Dieses Fusionsprotein hat ebenfalls, wie die erfindungsgemäßen Fusionsproteine, auf β -Glucuronidase-Basis eine für die Prodrugaktivierung günstige Pharmakokinetik (Tabelle 4).

Ferner können die erfindungsgemäßen Verbindungen nicht nur in Kombination mit einer Prodrug, sondern auch im Rahmen der gängigen Chemotherapie eingesetzt werden, bei der als Glucuronide metabolisierte und somit inaktivierte Zytostatika durch die applizierten Verbindungen wieder in ihre toxische Form umgewandelt werden können.

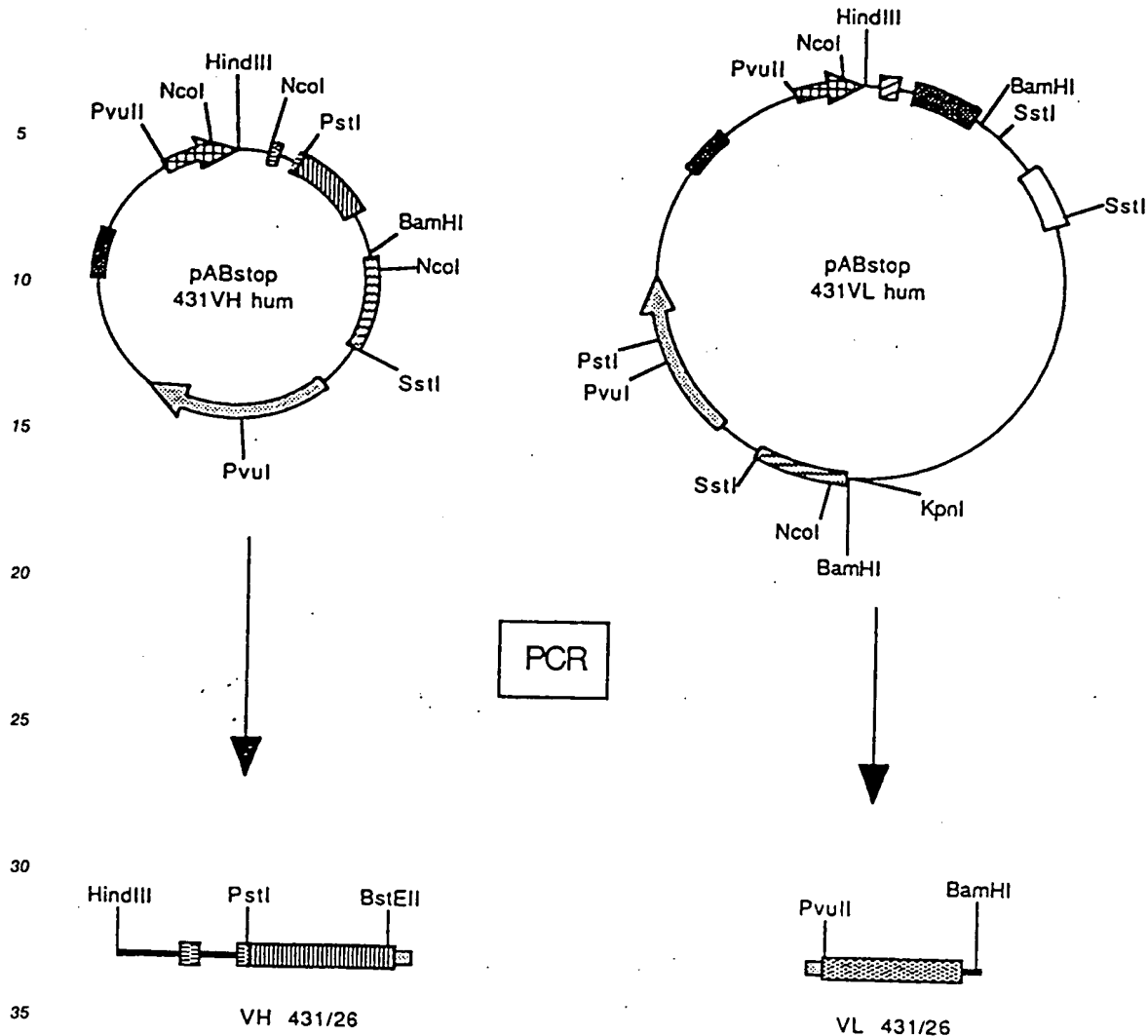
Die nachfolgenden Beispiele beschreiben nun die gentechnische Synthese von sFv-hu β -Gluc Fusionsproteinen, sowie den Nachweis der Funktionfähigkeit.

Ausgangsmaterial waren die Plasmide pABstop 431/26 hum V_H und pABstop 431/26 hum V_HL. Diese Plasmide enthalten die humanisierte Version des V_H- bzw. V_L-Gens des anti CEA MAK BW 431/26 (Güssow und Seemann, 1991, Meth. Enzymology, 203, 99-121). Als weiteres Ausgangsmaterial diente das Plasmid pABstop 431/26 V_H-hu β -Gluc 1H (EP-A2-0 501 215), das ein V_H-Exon, einschließlich der V_H-eigenen Signalsequenz, gefolgt von einem CH1-Exon, dem Hinge-Exon eines humanen IgG3 C-Gens und die vollständige cDNA der humanen β -Glucuronidase enthält.

Beispiel 1:

Amplifikation der V_H und V_L Gene des MAK hum 431/26

Mit den Oligonukleotiden pAB-Back und Linker-Anti (Tab. 2) wird aus pABstop 431V_H hum das V_H-Gen einschließlich der V_H-Gen eigenen Signalsequenz herausamplifiziert (V_H 431/26) (Güssow und Seemann, 1991, Meth. Enzymology, 203, 99-121). Mit den Oligonukleotiden Linker-Sense und V_L(M_u1)-For (Tab. 3) wird aus pABstop 431V_L hum das V_L-Gen herausamplifiziert (V_L 431/26).

**Beispiel 2:****Zusammenfügen der V_H 431/26 und V_L 431/26 Genfragmente**

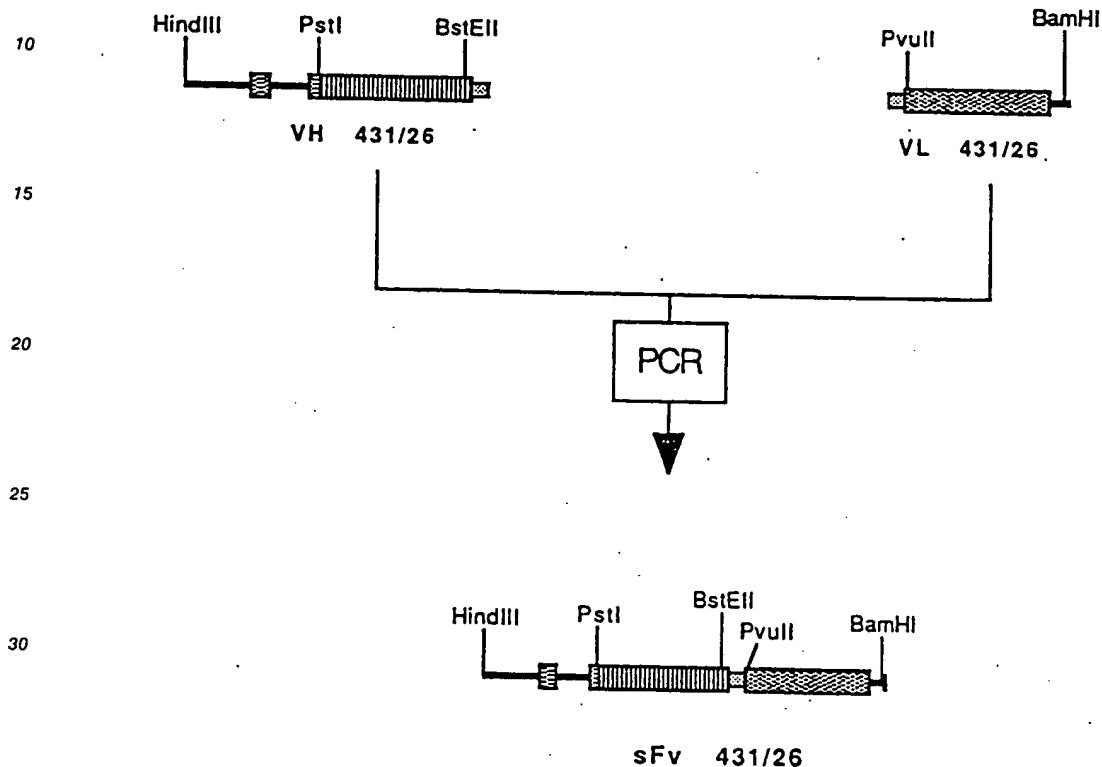
Die Oligonukleotide Linker-Anti und Linker-Sense sind partiell komplementär zueinander und codieren für einen Polypeptid-Linker, der die V_H- und V_L-Domäne zu einem sFv-Fragment verknüpfen soll. Um die amplifizierten V_H- mit den V_L-Fragmenten zu fusionieren, werden sie gereinigt und in einer 10 Zyklen Reaktion wie folgt eingesetzt:

H ₂ O:	37.5 µl
dNTPs (2.5 mM):	5.0 µl
PCR-Puffer (10x): Taq-Polymerase (Perkin-Elmer Corp., Emeryville, CA)	5.0 µl
(2.5 U/µl):	0.5 µl
0.5 µg/µl DNA des V _L -Frag.:	1.0 µl
0.5 µg/µl DNA des V _H -Frag.:	1.0 µl

PCR-Puffer (10x): 100mM Tris, pH8.3, 500mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.1% (w/v) Gelatin.

Die Oberfläche des Reaktionsgemisches wird mit Paraffin versiegelt und anschließend die 10 Zyklen Reaktion in einer PCR-Apparatur mit dem Programm 94°C, 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 2 min, durchge-

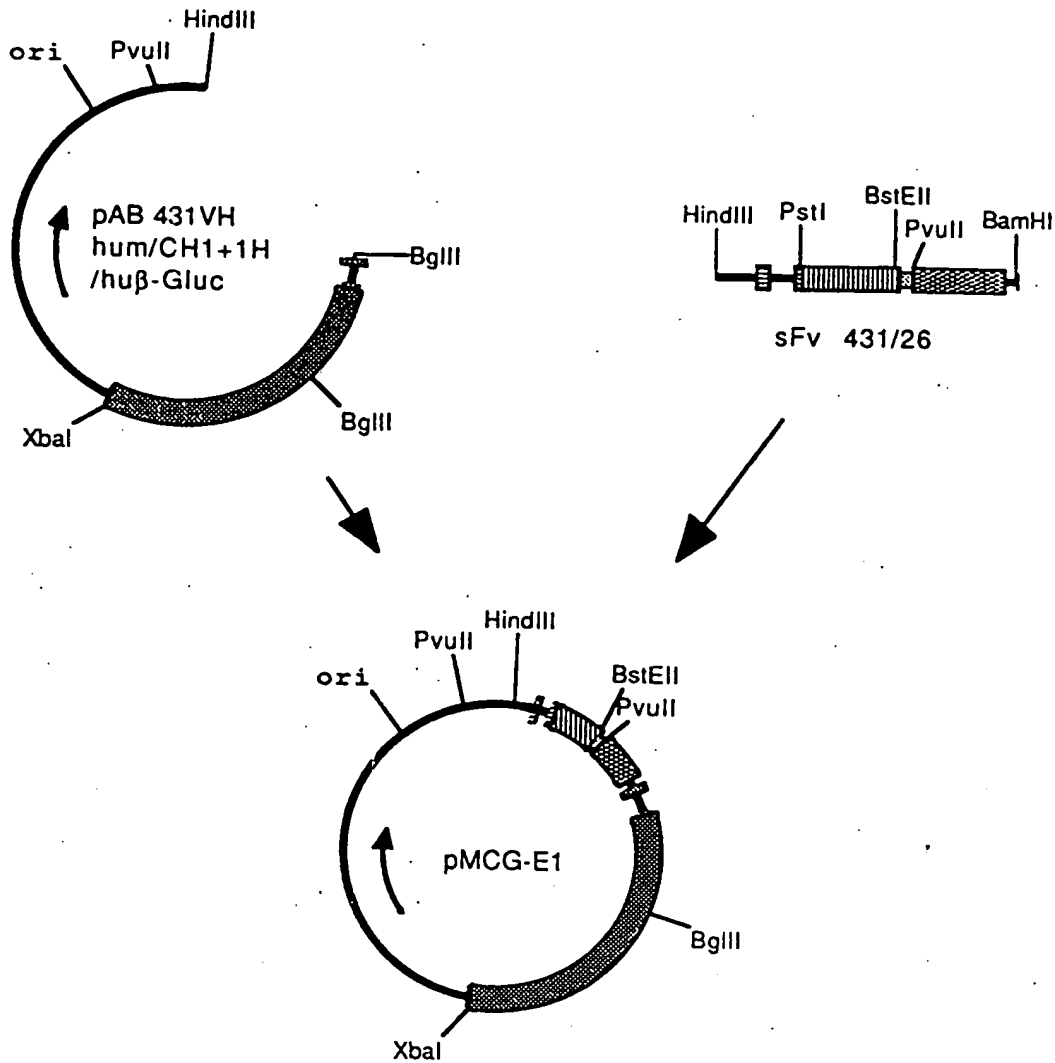
führt. Danach werden 2,5 pM der flankierenden Primer pAB-Back und $V_{L(Mut)}$ -For zugegeben und weitere 20 Zyklen durchgeführt. Man erhält ein PCR-Fragment, das aus dem V_H -Gen besteht, welches über einen Linker mit dem V_L -Gen verbunden ist. Vor dem V_H -Gen befindet sich noch die V_H -Gen eigene Signalsequenz. Durch das Oligonukleotid $V_{L(Mut)}$ -For wird gleichzeitig die letzte Nukleotidbase des V_L -Gens, ein C, gegen ein G ausgetauscht. Dieses PCR-Fragment codiert für einen humanisierten Single-Chain-Fv (sFv 431/26).



Beispiel 3:

Klonierung des sFv 431/26 Fragmentes in den Expressionsvektor, der das hu β -Glucuronidasegen enthält.

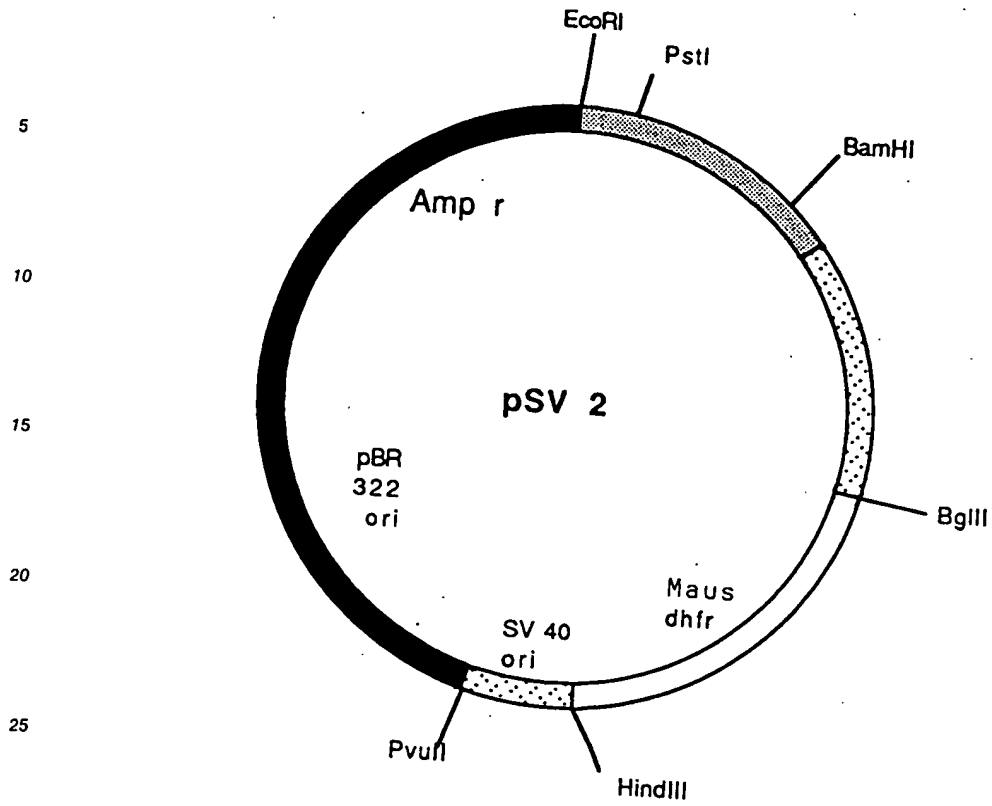
Das sFv-Fragment aus (2) wird mit HindIII und BamHI geschnitten und in den mit HindIII vollständig und mit BglII partiell gespaltenen Vektor pAB 431 V_H hum/CH1 + 1h/ β Glc ligiert. Der Vektor pABstop 431/26 V_H hu β Gluc1H enthält ein V_H -Exon, einschließlich der V_H -eigenen Signalsequenz, gefolgt von einem CH1-Exon, dem Hinge-Exon eines humanen IgG3 C-Gens und der vollständigen cDNA der humanen β -Glucuronidase. Es wird der Plasmidklon pMCG-E1 isoliert, der den humanisierten sFv 431/26, ein Hinge-Exon und das Gen für die humane β -Glucuronidase enthält (pMCG-E1).

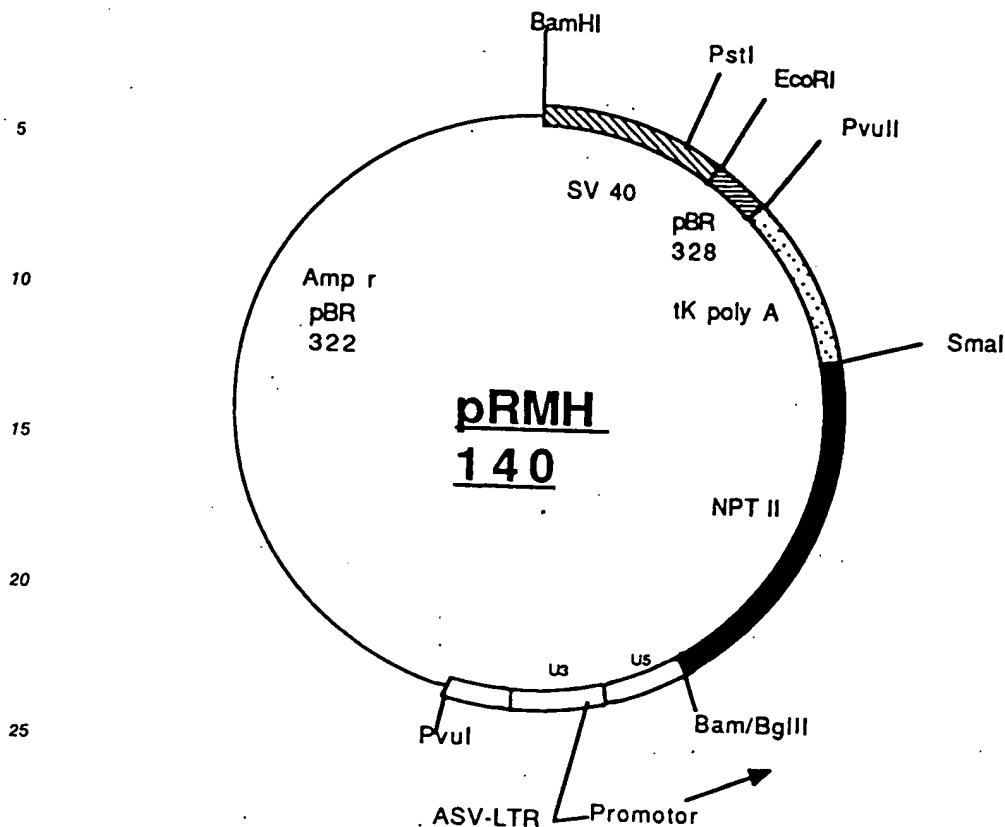


Beispiel 4:

Expression des sFv-hu β -Gluc Fusionsproteins in BHK Zellen.

Der Klon pMCG-E1 wird zusammen mit dem Plasmid pRMH 140, das ein Neomycin-Resistenzgen trägt und dem Plasmid pSV2, das ein Methotrexat-Resistenzgen trägt, in BHK Zellen transfiziert. Daraufhin wird in den BHK Zellen ein Fusionsprotein ausgeprägt, das sowohl die Antigenbindungseigenschaften des sAK BW 431/26hum als auch die enzymatische Aktivität der humanen β -Glucuronidase hat.



**Beispiel 5:****Nachweis der Antigenbindungseigenschaften und der enzymatischen Aktivität des sFv-hu β -Gluc Fusionsproteins.**

Die Fähigkeit des sFv-hu β -Gluc Fusionsproteins spezifisch an das durch den 431/26 definierte Epitop auf CEA zu binden und gleichzeitig die enzymatische Aktivität der humanen β -Glucuronidase auszuüben, wurde in einem Spezifitäts-Enzymaktivitätstest gezeigt (EP-A2-0501215). Der Test bestimmt die Freisetzung von 4-Methyl-umbelliferon aus 4-Methyl-umbelliferyl- β -Glucuronid durch den β -Glucuronidase Anteil des Fusionsproteins, nachdem das Fusionsprotein über den sFv-Anteil an ein Antigen gebunden ist. Die ermittelten Fluoreszenzwerte werden als relative Fluoreszenzeinheiten (FE) angegeben. Der Test zeigt eine signifikante Methyl-umbelliferon Freisetzung durch das Fusionsprotein in den mit CEA beschichteten Platten. Dagegen wird durch das Fusionsprotein kein Methyl-umbelliferon in mit PEM (polymorphic epithelial mucin) beschichteten Kontrollplatten freigesetzt.

Beispiel 6:**TSK-3000 Gelchromatographie**

Von dem über Anti-idiotyp Affinitätschromatographie gereinigten sFv-hu β -Gluc Fusionsprotein wurden 200 ng in 25 μ l auf einer TSK Gel G 3000 SW XL Säule (TOSO HAAS Best.Nr. 3.5Wx N3211, 7.8 mm x 300 mm) in einem geeigneten Laufmittel (PBS, pH 7.2, enthaltend 5 g/l Maltose und 4.2 g/l Arginin) mit einer Flußrate von 0.5 ml/min chromatographiert. Die Merck Hitachi HPLC-Anlage (L-4000 UV-Detektor, L-6210 Intelligent Pump, D-2500 Chromato-Integrator) wurde mit \approx 20 bar betrieben, die optische Dichte des Eluats wurde bei 280 nm bestimmt, und mittels eines LKB 2111 Multisac Fraktionssammlers wurden 0.5 ml Fraktionen gesammelt, die anschließend im Spezifitätsenzymaktivitätstest (SEAT) (EP 0501215 A2, Beispiel J) analysiert wurden. Das Ergebnis dieses Experimentes ist in Abb. 1 gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen,

daß die Position des durch optische Dichtemessung bei 280 nm detektierbaren Peaks mit dem Peak übereinstimmt, der die Spezifität und Enzymaktivität (SEAT) des Eluats bestimmt. Basierend auf den mittels Pfeilen angedeuteten Molekulargewichtspositionen von Standardproteinen kann gefolgert werden, daß das funktionell aktive sFv-hu β -Gluc Fusionsprotein unter nativen Bedingungen ein ungefähres Molekulargewicht von \approx 200 kDa hat.

Beispiel 7:

Aufarbeitung von Organen/Tumoren zur Fusionsproteinbestimmung

Folgende sequentielle Schritte wurden durchgeführt:

- mit Fusionsprotein bzw. Antikörperenzymkonjugat behandelte Nacktmäuse (CD1), die einen subkutanen Tumor haben, werden retroorbital entblutet und dann getötet
- das Blut wird sofort in ein Eppendorfgefäß gegeben, in dem sich schon 10 μ l Liquemin 25000 (Fa. Hoffman-LaRoche AG) befindet
- dann wird 10 min bei 2500 U/min in einer Zentrifuge (Megafuge 1.0, Fa. Heraeus) zentrifugiert
- danach wird das Plasma gewonnen und bis zur Testung eingefroren
- die Organe bzw. der Tumor werden entnommen und gewogen
- dann werden sie mit 2 ml 1 % BSA in PBS, pH 7.2, vollständig homogenisiert
- die Tumorhomogenate werden mit 0.1 N HCl auf pH 4.2 eingestellt (die Probe darf nicht übertitriert werden, da die β -Glucuronidase bei pH < 3.8 inaktiviert wird!)
- alle Homogenate werden 30 min bei 16000 g zentrifugiert
- der klare Überstand wird abgenommen
- die Tumorüberstände werden mit 0.1 N NaOH neutralisiert
- die Überstände und das Plasma können nun in immunologischen Tests quantifiziert werden.

Beispiel 8:

Triple-Determinanten-Test

Die Testung läuft folgendermaßen ab:

- pro Loch einer Mikrotitrationsplatte (Polystyrol U-Form, Typ B, Fa. Nunc, Best.Nr. 4-60445) werden 75 μ l eines mit 2 μ g/ml in PBS, pH 7.2, verdünnten Maus-anti-hu β -Gluc Antikörpers (MAK 2118/157 Behringwerke) gegeben
- die Mikrotitrationsplatten werden abgedeckt und über Nacht bei R.T. inkubiert
- anschließend werden die Mikrotitrationsplatten 3x mit 250 μ l 0.05 M Tris-Citrat-Puffer, pH 7.4, pro Loch gewaschen
- diese so beschichteten Mikrotitrationsplatten werden pro Loch mit je 250 μ l Blocklösung (1 % Casein in PBS, pH 7.2) für 30' bei R.T. inkubiert (Blockierung unspezifischer Bindungsstellen) (nicht benötigte beschichtete Mikrotitrationsplatten werden 24 Stunden bei R.T. getrocknet und dann zusammen mit Trockenpatronen zur Langzeitlagerung in beschichtete Aluminiumbeutel eingeschweißt)
- während der Blockierung wird in einer unbehandelten 96 Loch U-Boden Mikrotiterplatte (Polystyrol, Fa. Renner, Best.Nr. 12058) 10 Proben + 2 Positivkontrollen + 1 Negativkontrolle in 1 % Casein in PBS, pH 7.2, 1:2 in 8 Stufen ausverdünnt (ausgehend von 150 μ l Probe werden 75 μ l Probe in 75 μ l Casein-Vorlage pipettiert usw.)
- die Blocklösung wird von der mit anti-hu β -Gluc Antikörpern beschichteten Mikrotitrationsplatte abgesaugt, 50 μ l der verdünnten Proben werden pro Loch von der Verdünnungsplatte auf die Testplatte übertragen und 30 min bei R.T. inkubiert
- während der Probeninkubation wird das ABC-AP Reagenz (Fa. Vectastain, Best.Nr. AK-5000) angesetzt: 2 Tropfen Reagenz A (Avidin DH) in 10 ml 1 % Casein in PBS, pH 7.2, gut mischen und 2 Tropfen Reagenz B (Biotinylierte alkalische Phosphatase) zugeben, gut mischen. (Die ABC-AP Lösung muß mindestens 30' vor Gebrauch angesetzt werden.)
- die Testplatte wird 3 mal mit ELISA Waschpuffer (Behringwerke, Best.Nr. OSEW 96) gewaschen
- pro Loch werden 50 μ l Biotin markiertes Nachweisantikörpergemisch (1 + 1 Gemisch aus Maus Anti 431/26 Antikörper (MAK 2064/353, Behringwerke) und Maus anti CEA Antikörper (MAK 250/183, Behringwerke) mit einer Konzentration von je 5 μ g/ml verdünnt in 1 % Casein in PBS, pH 7.2, Endkonzentration 2.5 μ g/ml je Antikörper) gegeben
- die Testplatte wird 3 mal mit ELISA Waschpuffer gewaschen

- pro Loch werden 50 µl der vorbereiteten ABC-AP Lösung gegeben und 30 min bei R.T. inkubiert
- während der ABC-AP Inkubation wird das Substrat angesetzt (für jeden Test frisches Substrat: 1 mM 4-Methylumbelliferyl Phosphat, Best.Nr. M-8883, Fa. Sigma, in 0.5 M Tris + 0.01 % MgCl, pH 9.6)
- die Testplatte wird 7 mal mit ELISA Waschpuffer gewaschen
- 5 - pro Loch werden 50 µl Substrat aufgetragen, die Testplatte abgedeckt und 2 h bei 37° C inkubiert
- danach wird zu jedem Loch 150 µl Stopplösung (0.2 M Glycin + 0.2 % SDS, pH 11.7) hinzugegeben
- die fluorometrische Auswertung erfolgt im Fluoroscanner II (ICN Biomedicals, Kat.Nr. 78-611-00) bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm und einer Ausstrahlungswellenlänge von 460 nm
- anhand der Fluoreszenzwerte der im identischen Experiment mitgeführten Positivkontrolle (Verdünnungsreihe mit gereinigtem sFv-huβ-Gluc gemischt mit CEA 5 µg/ml als Eichkurve) wird die
- 10 unbekannte Konzentration von Fusionsprotein in der Probe bestimmt.

Beispiel 9:

15 Expression des sFv-huβ-Glucuronidase Fusionsproteins in Hefe.

Der Single-chain-Fv (sFv) aus Beispiel 2 wird mit den Oligos 2577 und 2561 (Tabelle 7) amplifiziert und in den mit XbaI/HindIII verdauten pUC19 Vektor kloniert (Abb. 2).

Das humane β-Glucuronidase Gen wird mit den Oligos 2562 und 2540 (Tabelle 8) aus dem Plasmid
20 pAB 431/26 V_Hhum/CH1 + 1H/huβ-Gluc (Beispiel 3) amplifiziert und in das mit BglII/HindIII geschnittene Plasmid sFv 431/26 in pUC19 (Abb. 2) ligiert (Abb. 3).

Ein KpnI/NcoI-Fragment wird mit den Oligos 2587 und 2627 (Tabelle 9) aus dem sFv 431/26 amplifiziert und in den mit KpnI/NcoI verdauten Hefe-Expressionsvektor pIXY 120 kloniert (Abb. 4).

Das BstEII/HindIII Fragment aus dem Plasmid sFv 431/26 huβ-Gluc in pUC19 (Abb. 3) wird in den mit
25 BstEII/partiell HindIII verdauten Vektor pIXY 120 ligiert, der das V_H-Gen, den Linker sowie einen Teil des V_L-Gens trägt (V_H/link/V_K part. in pIXY 120) (Abb. 5).

Das entstandene Plasmid sFv 431/26 huβ-Gluc in pIXY 120 wird in *Saccharomyces cerevisiae* transformiert und das Fusionsprotein ausgeprägt.

30 Beispiel 10:

Expression des sFv-E.coli-β-Glucuronidase Fusionsproteins in Hefe.

Das E.coli β-Glucuronidase Gen wird aus pRAJ 275 (Jefferson et al. Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 83:
35 8447-8451, 1986) mit den Oligos 2638 und 2639 (Tabelle 10) amplifiziert und in den mit BglII/ HindIII geschnittenen sFv 431/26 in pUC19 (Beispiel 9, Abb. 2) ligiert (Abb. 6).

Ein BstEII/HindIII Fragment aus sFv 431/26 E.coli β-Gluc in pUC19 wird in den mit BstEII/HindIII partiell verdauten Vektor V_H/link/V_Kpart in pIXY 120 (Beispiel 9, Abb. 4) kloniert (Abb. 7).

Das Plasmid sFv 431/26 E.coli β-Gluc in pIXY 120 wird in *Saccharomyces cerevisiae* transformiert und
40 das Fusionsprotein ausgeprägt.

Beispiel 11:

Expression des sFv-β-lactamase Fusionsproteins in Hefe.

Der Single-chain-Fv (sFv) aus Beispiel 2 wird mit den Oligos 2587 und 2669 (Tabelle 11) amplifiziert
45 und in den mit KpnI/HindIII verdauten pUC19 Vektor ligiert (Abb. 8).

Das β-lactamase II Gen (Hussain et al., J. Bacteriol. 164: 223-229, 1985) wird mit den Oligos 2673 und 2674 (Tabelle 11) aus Gesamt-DNA von *Bacillus cereus* amplifiziert und in den mit EcoRI/ HindIII verdauten
50 pUC19 Vektor ligiert (Abb. 9). Ein BclI/ HindIII Fragment des β-lactamase Gens wird in den mit BglII/ HindIII geschnittenen sFv 431/26 in pUC19 ligiert (Abb. 10).

Das KpnI/HindIII sFv-β-lactamase Fragment wird in den mit KpnI/partiell HindIII verdauten pIXY 120 ligiert (Abb. 11). Das Plasmid wird in *Saccharomyces cerevisiae* transformiert und ein Fusionsprotein
55 ausgeprägt, das sowohl die Antigenbindungseigenschaften des MAk 431/26 als auch die enzymatische Aktivität der β-lactamase von *Bacillus cereus* trägt.

Tabelle 1:

	CCAAGCTTAT GAATATGCAA ATCCTGCTCA TGAATATGCA AATCCTCTGA	50
5	ATCTACATGG TAAATATAGG TTTGTCTATA CCACAAACAG AAAAACATGA	100
	GATCACAGTT CTCTCTACAG TTAGCTGAGCA CACAGGACCT CACC ATG GGA TGG	153
	Met Gly Trp	
10	AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGTAAGGGGC	199
	Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr	
	-10	
	TCACAGTAGC AGGCTTGAGG TCTGGACATA TATATGGGTG ACAATGACAT	249
	CCACTTTGCC TTTCTCTCCA CA GGT GTC CAC TCC CAG GTC CAA CTG CAG	298
15	Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln	
	1	
	GAG AGC GGT CCA GGT CTT GTG AGA CCT AGC CAG ACC CTG AGC CTG	343
	Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu	
	10 20	
20	ACC TGC ACC GTG TCT GGC TTC ACC ATC AGC AGT GGT TAT AGC TGG	388
	Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Gly Tyr Ser Trp	
	30	
	CAC TGG GTG AGA CAG CCA CCT GGA CGA GGT CTT GAG TGG ATT GGA	433
	His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly	
	40 50	
25	TAC ATA CAG TAC AGT GGT ATC ACT AAC TAC AAC CCC TCT CTC AAA	478
	Tyr Ile Gln Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys	
	60	
	AGT AGA GTG ACA ATG CTG GTA GAC ACC AGC AAG AAC CAG TTC AGC	523
	Ser Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser	
	70 80	
30	CTG AGA CTC AGC AGC GTG ACA GCC GCC GAC ACC GCG GTC TAT TAT	568
	Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr	
	90	
	TGT GCA AGA GAA GAC TAT GAT TAC CAC TGG TAC TTC GAT GTC TGG	613
	Cys Ala Arg Glu Asp Tyr Asp Tyr His Trp Tyr Phe Asp Val Trp	
	100 110	
35	GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGA GGC GGT GGA TCG	658
	Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser	
	120	
	GGC GGT GGT GGG TCG GGT GGC GGC GGA TCT GAC ATC CAG CTG ACC	703
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr	
	130 140	
40	CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA GTG ACC	748
	Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr	
	150	
	ATC ACC TGT AGT ACC AGC TCG AGT GTA AGT TAC ATG CAC TGG TAC	793
	Ile Thr Cys Ser Thr Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr	
	160 170	
45	CAG CAG AAG CCA GGT AAG GCT CCA AAG CTG CTG ATC TAC AGC ACA	838
	Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr	
	180	
50		
55		

Tabelle 1 (Fortsetzung):

	TCC AAC CTG GCT TCT GGT GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT	883
	Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly	
	190 200	
5	AGC GGT ACC GAC TTC ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG	928
	Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu	
	210	
	GAC ATC GCC ACC TAC TAC TGC CAT CAG TGG AGT AGT TAT CCC ACG	973
	Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Thr	
	220 230	
10	TTC GGC CAA GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA GGTGAGTAGA ATTTAAACTT	1023
	Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
	240	
	TGCTTCCTCA GTTGATCTG AGTAACTCCC AATCTTCTCT CTGCA GAG CTC AAA	1077
	Glu Leu Lys	
15	ACC CCA CTT GGT GAC ACA ACT CAC ACA TGC CCA CGG TGC CCA	1119
	Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro	
	250	
	GGTAAGCCAG CCCAGGACTC GCCCTCCAGC TCAAGGCGGG ACAAGAGCCC	1169
	TAGAGTGGCC TGAGTCCAGG GACAGGCCCC AGCAGGGTGC TGACGCATCC	1219
20	ACCTCCATCC CAGATCCCCG TAACTCCCAA TCTTCTCTCT GCA GCG GCG GCG	1271
	Ala Ala Ala	
	260	
	GCG GTG CAG GGC GGG ATG CTG TAC CCC CAG GAG AGC CCG TCG CGG	1316
	Ala Val Gln Gly Gly Met Leu Tyr Pro Gln Glu Ser Pro Ser Arg	
25	270	
	GAG TGC AAG GAG CTG GAC GGC CTC TGG AGC TTC CGC GCC GAC TTC	1361
	Glu Cys Lys Glu Leu Asp Gly Leu Trp Ser Phe Arg Ala Asp Phe	
	280 290	
	TCT GAC AAC CGA CGC CGG GGC TTC GAG GAG CAG TGG TAC CGG CGG	1406
	Ser Asp Asn Arg Arg Arg Gly Phe Glu Glu Gln Trp Tyr Arg Arg	
30	300	
	CCG CTG TGG GAG TCA GGC CCC ACC GTG GAC ATG CCA GTT CCC TCC	1451
	Pro Leu Trp Glu Ser Gly Pro Thr Val Asp Met Pro Val Pro Ser	
	310 320	
	AGC TTC AAT GAC ATC AGC CAG GAC TGG CGT CTG CGG CAT TTT GTC	1496
	Ser Phe Asn Asp Ile Ser Gln Asp Trp Arg Leu Arg His Phe Val	
35	330	
	GGC TGG GTG TGG TAC GAA CGG GAG GTG ATC CTG CCG GAG CGA TGG	1541
	Gly Trp Val Trp Tyr Glu Arg Glu Val Ile Leu Pro Glu Arg Trp	
	340 350	
	ACC CAG GAC CTG CGC ACA AGA GTG GTG CTG AGG ATT GGC AGT GCC	1586
	Thr Gln Asp Leu Arg Thr Arg Val Val Leu Arg Ile Gly Ser Ala	
40	360	
	CAT TCC TAT GCC ATC GTG TGG GTG AAT GGG GTC GAC ACG CTA GAG	1631
	His Ser Tyr Ala Ile Val Trp Val Asn Gly Val Asp Thr Leu Glu	
	370 380	
	CAT GAG GGG GGC TAC CTC CCC TTC GAG GCC GAC ATC AGC AAC CTG	1676
	His Glu Gly Gly Tyr Leu Pro Phe Glu Ala Asp Ile Ser Asn Leu	
45	390	
	GTC CAG GTG GGG CCC CTG CCC TCC CGG CTC CGA ATC ACT ATC GCC	1721
	Val Gln Val Gly Pro Leu Pro Ser Arg Leu Arg Ile Thr Ile Ala	
	400 410	

50

55

Tabelle 1 (Fortsetzung):

5	ATC	AAC	AAC	ACA	CTC	ACC	CCC	ACC	ACC	CTG	CCA	CCA	GGG	ACC	ATC	1766
	Ile	Asn	Asn	Thr	Leu	Thr	Pro	Thr	Thr	Leu	Pro	Pro	Gly	Thr	Ile	
										420						
	CAA	TAC	CTG	ACT	GAC	ACC	TCC	AAG	TAT	CCC	AAG	GGT	TAC	TTT	GTC	1811
	Gln	Tyr	Leu	Thr	Asp	Thr	Ser	Lys	Tyr	Pro	Lys	Gly	Tyr	Phe	Val	
					430										440	
10	CAG	AAC	ACA	TAT	TTT	GAC	TTT	TTC	AAC	TAC	GCT	GGA	CTG	CAG	CGG	1856
	Gln	Asn	Thr	Tyr	Phe	Asp	Phe	Phe	Asn	Tyr	Ala	Gly	Leu	Gln	Arg	
										450						
	TCT	GTA	CTT	CTG	TAC	ACG	ACA	CCC	ACC	ACC	TAC	ATC	GAT	GAC	ATC	1901
	Ser	Val	Leu	Leu	Tyr	Thr	Thr	Pro	Thr	Thr	Tyr	Ile	Asp	Asp	Ile	
					460										470	
15	ACC	GTC	ACC	ACC	AGC	GTG	GAG	CAA	GAC	AGT	GGG	CTG	GTG	AAT	TAC	1946
	Thr	Val	Thr	Thr	Ser	Val	Glu	Gln	Asp	Ser	Gly	Leu	Val	Asn	Tyr	
										480						
	CAG	ATC	TCT	GTC	AAG	GGC	AGT	AAC	CTG	TTC	AAG	TTG	GAA	GTG	CGT	1991
	Gln	Ile	Ser	Val	Lys	Gly	Ser	Asn	Leu	Phe	Lys	Leu	Glu	Val	Arg	
					490										500	
20	CTT	TTG	GAT	GCA	GAA	AAC	AAA	GTC	GTG	GCG	AAT	GGG	ACT	GGG	ACC	2036
	Leu	Leu	Asp	Ala	Glu	Asn	Lys	Val	Val	Ala	Asn	Gly	Thr	Gly	Thr	
										510						
	CAG	GGC	CAA	CTT	AAG	GTG	CCA	GGT	GTC	AGC	CTC	TGG	TGG	CCG	TAC	2081
	Gln	Gly	Gln	Leu	Lys	Val	Pro	Gly	Val	Ser	Leu	Trp	Trp	Pro	Tyr	
					520										530	
25	CTG	ATG	CAC	GAA	CGC	CCT	GCC	TAT	CTG	TAT	TCA	TTG	GAG	GTG	CAG	2126
	Leu	Met	His	Glu	Arg	Pro	Ala	Tyr	Leu	Tyr	Ser	Leu	Glu	Val	Gln	
										540						
	CTG	ACT	GCA	CAG	ACG	TCA	CTG	GGG	CCT	GTG	TCT	GAC	TTT	TAC	ACA	2171
	Leu	Thr	Ala	Gln	Thr	Ser	Leu	Gly	Pro	Val	Ser	Asp	Phe	Tyr	Thr	
					550										560	
30	CTC	CCT	GTG	GGG	ATC	CGC	ACT	GTG	GCT	GTC	ACC	AAG	AGC	CAG	TTC	2216
	Leu	Pro	Val	Gly	Ile	Arg	Thr	Val	Ala	Val	Thr	Lys	Ser	Gln	Phe	
										570						
	CTC	ATC	AAT	GGG	AAA	CCT	TTC	TAT	TTC	CAC	GGT	GTC	AAC	AAG	CAT	2261
	Leu	Ile	Asn	Gly	Lys	Pro	Phe	Tyr	Phe	His	Gly	Val	Asn	Lys	His	
					580										590	
35	GAG	GAT	GCG	GAC	ATC	CGA	GGG	AAG	GGC	TTC	GAC	TGG	CCG	CTG	CTG	2306
	Glu	Asp	Ala	Asp	Ile	Arg	Gly	Lys	Gly	Phe	Asp	Trp	Pro	Leu	Leu	
										600						
	GTG	AAG	GAC	TTC	AAC	CTG	CTT	CGC	TGG	CTT	GGT	GCC	AAC	GCT	TTC	2351
	Val	Lys	Asp	Phe	Asn	Leu	Leu	Arg	Trp	Leu	Gly	Ala	Asn	Ala	Phe	
					610										620	
40	CGT	ACC	AGC	CAC	TAC	CCC	TAT	GCA	GAG	GAA	GTG	ATG	CAG	ATG	TGT	2396
	Arg	Thr	Ser	His	Tyr	Pro	Tyr	Ala	Glu	Glu	Val	Met	Gln	Met	Cys	
										630						
	GAC	CGC	TAT	GGG	ATT	GTG	GTC	ATC	GAT	GAG	TGT	CCC	GGC	GTG	GGC	2441
	Asp	Arg	Tyr	Gly	Ile	Val	Val	Ile	Asp	Glu	Cys	Pro	Gly	Val	Gly	
					640										650	
45	CTG	GCG	CTG	CCG	CAG	TTC	TTC	AAC	AAC	GTT	TCT	CTG	CAT	CAC	CAC	2486
	Leu	Ala	Leu	Pro	Gln	Phe	Phe	Asn	Asn	Val	Ser	Leu	His	His	His	
										660						
	ATG	CAG	GTG	ATG	GAA	GAA	GTG	GTG	CGT	AGG	GAC	AAG	AAC	CAC	CCC	2531
	Met	Gln	Val	Met	Glu	Glu	Val	Val	Arg	Arg	Asp	Lys	Asn	His	Pro	
50					670										680	

GCG	GTG	GTG	ATG	TGG	TCT	GTG	GCC	AAC	GAG	CCT	GCG	TCC	CAC	CTA	2576
Ala	Val	Val	Met	Trp	Ser	Val	Ala	Asn	Glu	Pro	Ala	Ser	His	Leu	
									690						
GAA	TCT	GCT	GGC	TAC	TAC	TTG	AAG	ATG	GTG	ATC	GCT	CAC	ACC	AAA	2621
Glu	Ser	Ala	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Lys	Met	Val	Ile	Ala	His	Thr	Lys	
				700										710	
TCC	TTG	GAC	CCC	TCC	CGG	CCT	GTG	ACC	TTT	GTG	AGC	AAC	TCT	AAC	2666
Ser	Leu	Asp	Pro	Ser	Arg	Pro	Val	Thr	Phe	Val	Ser	Asn	Ser	Asn	
									720						
TAT	GCA	GCA	GAC	AAG	GGG	GCT	CCG	TAT	GTG	GAT	GTG	ATC	TGT	TTG	2711
Tyr	Ala	Ala	Asp	Lys	Gly	Ala	Pro	Tyr	Val	Asp	Val	Ile	Cys	Leu	
				730										740	
AAC	AGC	TAC	TAC	TCT	TGG	TAT	CAC	GAC	TAC	GGG	CAC	CTG	GAG	TTG	2756
Asn	Ser	Tyr	Tyr	Ser	Trp	Tyr	His	Asp	Tyr	Gly	His	Leu	Glu	Leu	
									750						
ATT	CAG	CTG	CAG	CTG	GCC	ACC	CAG	TTT	GAG	AAC	TGG	TAT	AAG	AAG	2801
Ile	Gln	Leu	Gln	Leu	Ala	Thr	Gln	Phe	Glu	Asn	Trp	Tyr	Lys	Lys	
				760										770	
TAT	CAG	AAG	CCC	ATT	ATT	CAG	AGC	GAG	TAT	GGA	GCA	GAA	ACG	ATT	2846
Tyr	Gln	Lys	Pro	Ile	Ile	Gln	Ser	Glu	Tyr	Gly	Ala	Glu	Thr	Ile	
									780						
GCA	GGG	TTT	CAC	CAG	GAT	CCA	CCT	CTG	ATG	TTC	ACT	GAA	GAG	TAC	2891
Ala	Gly	Phe	His	Gln	Asp	Pro	Pro	Leu	Met	Phe	Thr	Glu	Glu	Tyr	
				790										800	
CAG	AAA	AGT	CTG	CTA	GAG	CAG	TAC	CAT	CTG	GGT	CTG	GAT	CAA	AAA	2936
Gln	Lys	Ser	Leu	Leu	Glu	Gln	Tyr	His	Leu	Gly	Leu	Asp	Gln	Lys	
									810						
CGC	AGA	AAA	TAT	GTG	GTT	GGA	GAG	CTC	ATT	TGG	AAT	TTT	GCC	GAT	2981
Arg	Arg	Lys	Tyr	Val	Val	Gly	Glu	Leu	Ile	Trp	Asn	Phe	Ala	Asp	
				820										830	
TTC	ATG	ACT	GAA	CAG	TCA	CCG	ACG	AGA	GTG	CTG	GGG	ATT	AAA	AAG	3026
Phe	Met	Thr	Glu	Gln	Ser	Pro	Thr	Arg	Val	Leu	Gly	Asn	Lys	Lys	
									840						
GGG	ATC	TTC	ACT	CGG	CAG	AGA	CAA	CCA	AAA	AGT	GCA	GCG	TTC	CTT	3071
Gly	Ile	Phe	Thr	Arg	Gln	Arg	Gln	Pro	Lys	Ser	Ala	Ala	Phe	Leu	
				850										860	
TTG	CGA	GAG	AGA	TAC	TGG	AAG	ATT	GCC	AAT	GAA	ACC	AGG	TAT	CCC	3116
Leu	Arg	Glu	Arg	Tyr	Trp	Lys	Ile	Ala	Asn	Glu	Thr	Arg	Tyr	Pro	
									870						
CAC	TCA	GTA	GCC	AAG	TCA	CAA	TGT	TTG	GAA	AAC	AGC	CCG	TTT	ACT	3161
His	Ser	Val	Ala	Lys	Ser	Gln	Cys	Leu	Glu	Asn	Ser	Pro	Phe	Thr	
				880										890	
TGA	GCAAGACTGA	TACCACCTGC	GTGTCCCTTC	CTCCCCGAGT	CAGGGCGACT										3214
...															
TCCACAGCAG	CAGAACAAGT	GCCTCCTGGA	CTGTTACAGG	CAGACCAGAA											3264
CGTTTCTGGC	CTGGGTTTTG	TGGTCATCTA	TTCTAGCAGG	GAACACTAAA											3314

pAB-Back:

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Tabelle 4

Pharmakokinetik des sFv-hu β Gluc Fusionsproteins in MzSto1 tragenden CD1 nu/nu Mäusenng sFv-hu β Gluc pro Gramm Gewebe bzw ml Plasma gemessen im Tripledeterminantentest

Gewebe/typ	Maus1		Maus2		Maus3		Maus4		Maus5a		Maus5b	
	0,05Std	3Std	24Std	48Std	120Std	120Std	120Std	120Std	120Std	120Std	120Std	120Std
Tumor	24,8	4	7,7	2,1	2,2	6,2						
Milz	15,4	4,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1						
Leber	40,9	10,1	0,8	0,8	0,3	<0,1						
Darm	5,2	4,4	1,1	1,2	0,6	<0,1						
Niere	44,4	7	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1						
Lunge	154,8	17,3	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1						
Herz	148,3	8,2	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1						
Plasma	630,9	95	2,7	0,4	<0,1	<0,1						

i.v. Injektion von 0,8 μ g gereinigtem Fusionsprotein pro Maus

Tabelle 5

Monosaccharid-Komponentenanalytik des Kohlehydratanteils des sFv-huβ-Gluc Fusionsproteins aus BHK-Zellen

Das gereinigte sFv-huβ-Gluc Fusionsprotein wurde auf seinen Kohlehydratanteil hin untersucht. Dabei wurden nach Hydrolyse folgende Einzelkomponenten im angegebenen Molverhältnis gefunden (mol Kohlenhydrat/mol sFv-huβ-Gluc).

	Fukose	Galaktosamin	N-Acetylglukosamin	Galaktose	Glukose	Mannose	N-Acetylneuraminsäure
sFv-huβ-Gluc	4	2	30	8	1	43	4

Aus den Molverhältnissen von Mannose, Glukosamin und Galaktose kann auf das Vorliegen von "High-Mannose Type"- und/oder "Hybrid Type"-Strukturen (neben "Complex Type"-Strukturen) geschlossen werden. Endständig treten deshalb Mannose, Galaktose, - Acetylneuraminsäure und evtl. N-Acetylglukosamin auf, wobei Mannose auch als Mannose-6-phosphat vorliegen kann.

Methoden:

Die Neuraminsäurebestimmung erfolgte nach Hermentin und Seidat (1991) GBF Monographs Volume 15, S. 185 - 188 (nach 30 min. Hydrolyse in Gegenwart von 0.1 N Schwefelsäure bei 80°C und nachfolgender Neutralisation mit 0.4 N Natronlauge) mittels "high-pH anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection" (HPAE-PAD). Die Bestimmung der Monosaccharid-Komponenten erfolgte (nach 4 h Hydrolyse in Gegenwart von 2 N Trifluoressigsäure bei 100°C und Einengung zur Trockne in einer SpeedVac) ebenfalls mittels HPAE-PAD in Anlehnung an das von Hardy et al. (1988) Analytical Biochemistry 170, 54 - 62 beschriebene Verfahren.

Tabelle 6

Monosaccharid-Komponentenanalyse des Kohlenhydratanteiles des sFv-hu β Gluc Fusionsproteins aus *Saccharomyces cerevisiae*.

	Glukosamin	Glucose	Mannose	
sFv-hu β Gluc (mol/mol)	6	12	150	mol/mol

Tabelle 7:

Oligos für sFv 431/26 Klonierung in pUC 19

5

sFv for (2561)

10

5' TTT TTA AGC TTA GAT CTC CAC CTT GGT C 3'

15

sFv back (2577)

5' AAA AAT CTA GAA TGC AGG TCC AAC TGC AGG
AGA G 3'

20

25

Tabelle 8:

Oligos für hum.β-Gluc Klonierung in sFv pUC 19

30

Hum.β-Gluc. back Oligo (2562)

35

5' AAA AAA GTG ATC AAA GCG TCT GGC GGG CCA CAG
GGC GGG ATC CTG TAC 3'

Hum.β-Gluc for Oligo (2540)

40

5' TTT TAA GCT TCA AGT AAA CGG GCT GTT 3'

45

50

55

Tabelle 9:

5 Oligos für sFv/hum- β -Gluc Klonierung in pIXY120

10 PCR Oligo VHpIXY back (2587)

5' TTT TGG TAC CTT TGG ATA AAA GAC AGG TCC AAC TGC AGG AGA G 3'

15 PCR Oligo VKpIXY for (2627)

20 5' A AAA CCA TGG GAA TTC AAG CTT CGA GCT GGT ACT ACA GGT 3'

25 Tabelle 10:

30 Oligos für E.coli- β -Gluc Klonierung in sFv pUC 19

35 E. coli- β -Gluc. for (2639)

5' TTT TAA GCT TCC ATG GCG GCC GCT CAT TGT TTG
CCT CCC TGC TG 3'

40 E. coli- β -Gluc. back (2638)

45 5' AAA AAG ATC TCC GCG TCT GGC GGG CCA CAG TTA
CGT GTA GAA ACC CCA 3'

50

55

Tabelle 11:

Oligos für sFv/ β -lactamase Klonierung in pIXY120

PCR Oligo VHpIXY back (2587)

5' TTT TGG TAC CTT TGG ATA AAA GAC AGG TCC AAC TGC AGG AGA G 3'

PCR Oligo VKpIXY/ β -lactamase for (2669)

5' AAA AAG CTT AGA TCT CCA GCT TGG TCC C 3'

PCR Oligo link/ β -lactamase back (2673)

5' AAA GAA TTC TGA TCA AAT CCT CGA GCT CAG GTT CAC
AAA AGG TAG AGA AAA CAG T 3' Linker

PCR Oligo β -lactamase for (2674)

5' TTT AAG CTT ATT TTA ATA AAT CCA ATG T 3'

Patentansprüche

1. Verbindung, enthaltend eine Antigenbinderegion, welche an mindestens ein prodrug-aktivierendes Enzym gebunden ist, dadurch gekennzeichnet, daß die Antigenbinderegion aus einer einzigen Polypeptidkette besteht.
2. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung kovalent gebundene Kohlenhydrate trägt.
3. Verbindung nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Antigenbinderegion eine variable Domäne einer schweren Antikörperkette und eine variable Domäne einer leichten Antikörperkette enthält (sFv-Fragment).
4. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Antigenbinderegion an ein tumorassoziiertes Antigen (TAA) bindet.
5. Verbindung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das TAA ein N-CAM, PEM, EGF-R, Sialyl-Le^a, Sialyl-Le^x, TFB, GlcA, GD₃, GD₂, TAG72, CA125, das durch den MAK L6 definierte 24-25 kDa Glycoprotein oder CEA, vorzugsweise ein CEA ist.

6. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym eine Lactamase, vorzugsweise eine *Bacillus cereus* II β -lactamase, Pyroglutamat-Aminopeptidase, D-Aminopeptidase, Oxidase, Peroxidase, Phosphatase, Hydroxynitrilase, Protease, Esterase, Carboxypeptidase, vorzugsweise eine Carboxypeptidase G2 aus *Pseudomonas* oder Glycosidase ist.
- 5 7. Verbindung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym eine β -Glucuronidase, vorzugsweise eine *E.coli*, *Kobayasia nipponica*, *Secale cereale* oder humane β -Glucuronidase ist.
8. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Antigenbinderegion
10 über einen Peptidlinker mit dem Enzym verbunden ist.
9. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Glycosylierung entweder mittels chemischer Methoden oder durch Auswahl geeigneter Expressionssysteme erfolgt.
- 15 10. Verbindung nach Anspruch 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß sie sekretorisch in *Saccharomyces cerevisiae* bzw. vorteilhafter in *Hansenula polymorpha* exprimiert wird.
11. Verbindung nach Anspruch 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß sie in *E. coli* exprimiert wird und anschließend chemisch glycosyliert, vorzugsweise galaktosyliert und/oder mannosyliert wird.
- 20 12. Verbindung nach Anspruch 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß das sFv β -lactamase Fusionsprotein, welches periplasmatisch in *E. coli* exprimiert wurde, chemisch glycosyliert, vorzugsweise galaktosyliert und/oder mannosyliert ist.
- 25 13. Verbindung nach Anspruch 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß das sFv β -lactamase Fusionsprotein sekretorisch in *Saccharomyces cerevisiae* bzw. *Hansenula polymorpha* exprimiert ist.
14. Nukleinsäure, kodierend für eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8.
- 30 15. Nukleinsäure nach Anspruch 14, kodierend für ein humanisiertes sFv-Fragment gegen CEA und eine humane β -Glucuronidase.
16. Nukleinsäure nach Anspruch 14 mit der Sequenz gemäß Tab. 1.
- 35 17. Vektor, enthaltend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 14 bis 16.
18. Wirtszelle, enthaltend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 14 bis 16 oder einen Vektor nach Anspruch 17.
- 40 19. Wirtszelle nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine BHK-, CHO-, COS-, HeLa-, Insekten-, Tabakpflanzen-, Hefe- oder *E.coli*-Zelle ist.
20. Transgene Säugetiere mit Ausnahme von Mensch, enthaltend eine DNA nach einem der Ansprüche 14 bis 16 oder einen Vektor nach Anspruch 17.
- 45 21. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung nach Anspruch 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß
 - a) eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 14 bis 16 oder ein Vektor nach Anspruch 17 in eine Wirtszelle eingebracht wird,
 - b) die Wirtszelle kultiviert und
 - 50 c) die Verbindung isoliert wird.
22. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung nach Anspruch 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß
 - a) eine Wirtszelle nach Anspruch 18 oder 19 kultiviert und
 - b) die Verbindung isoliert wird.
- 55 23. Verwendung der Verbindung nach Anspruch 1 bis 13 zur Herstellung eines Arzneimittels oder eines Diagnostikums.

EP 0 590 530 A2

24. Verwendung der Verbindung nach Anspruch 1 bis 13 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krebs.

25. Arzneimittel, enthaltend eine Verbindung nach Anspruch 1 bis 13.

26. Diagnostikum, enthaltend eine Verbindung nach Anspruch 1 bis 13.

5

10

15

20

25

30

35

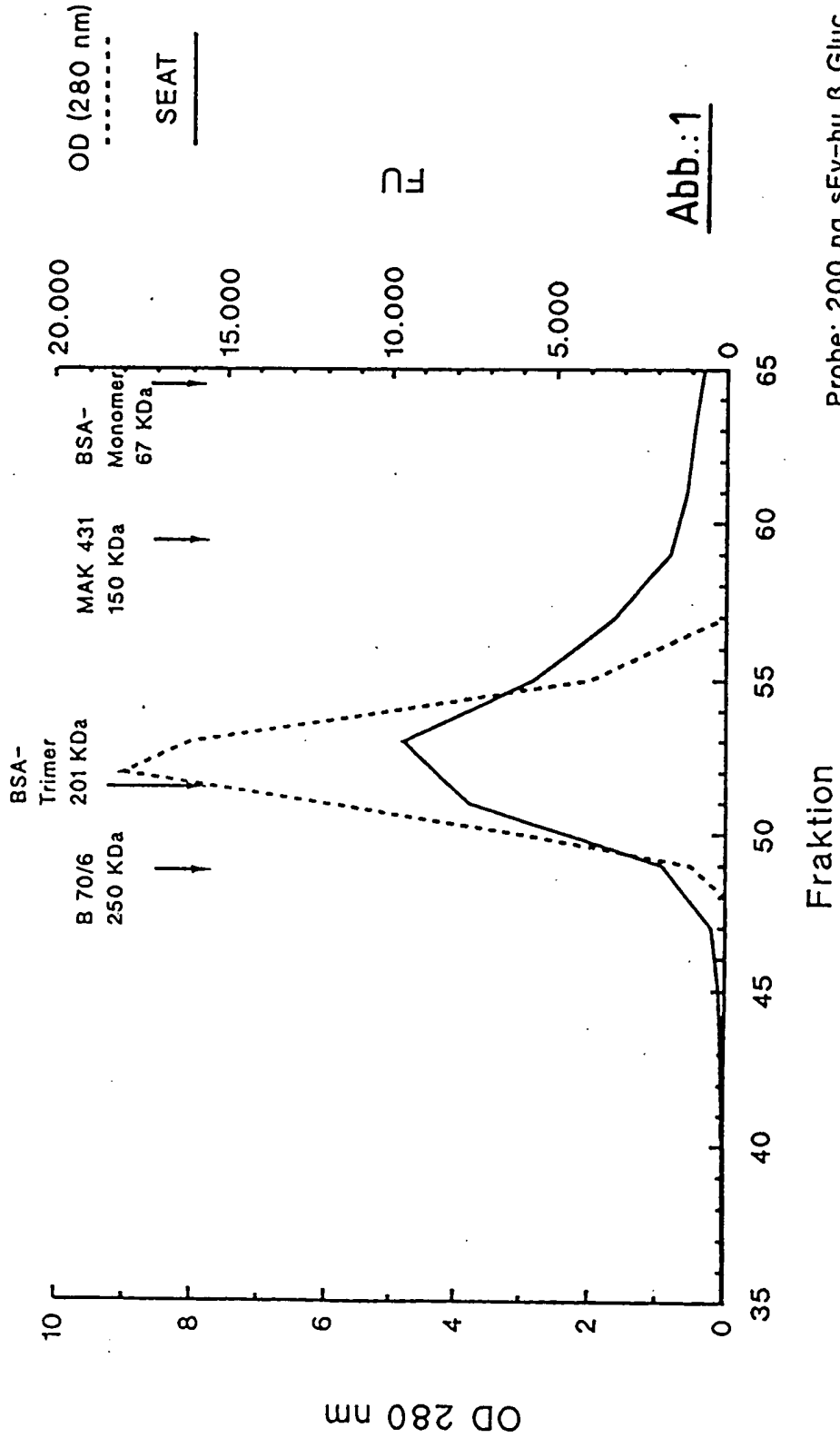
40

45

50

55

TSK 3000 Gelchromatographie



Probe: 200 ng sFv-hu β Gluc
Fusionsprotein in 25 μ l

Abb.: 2

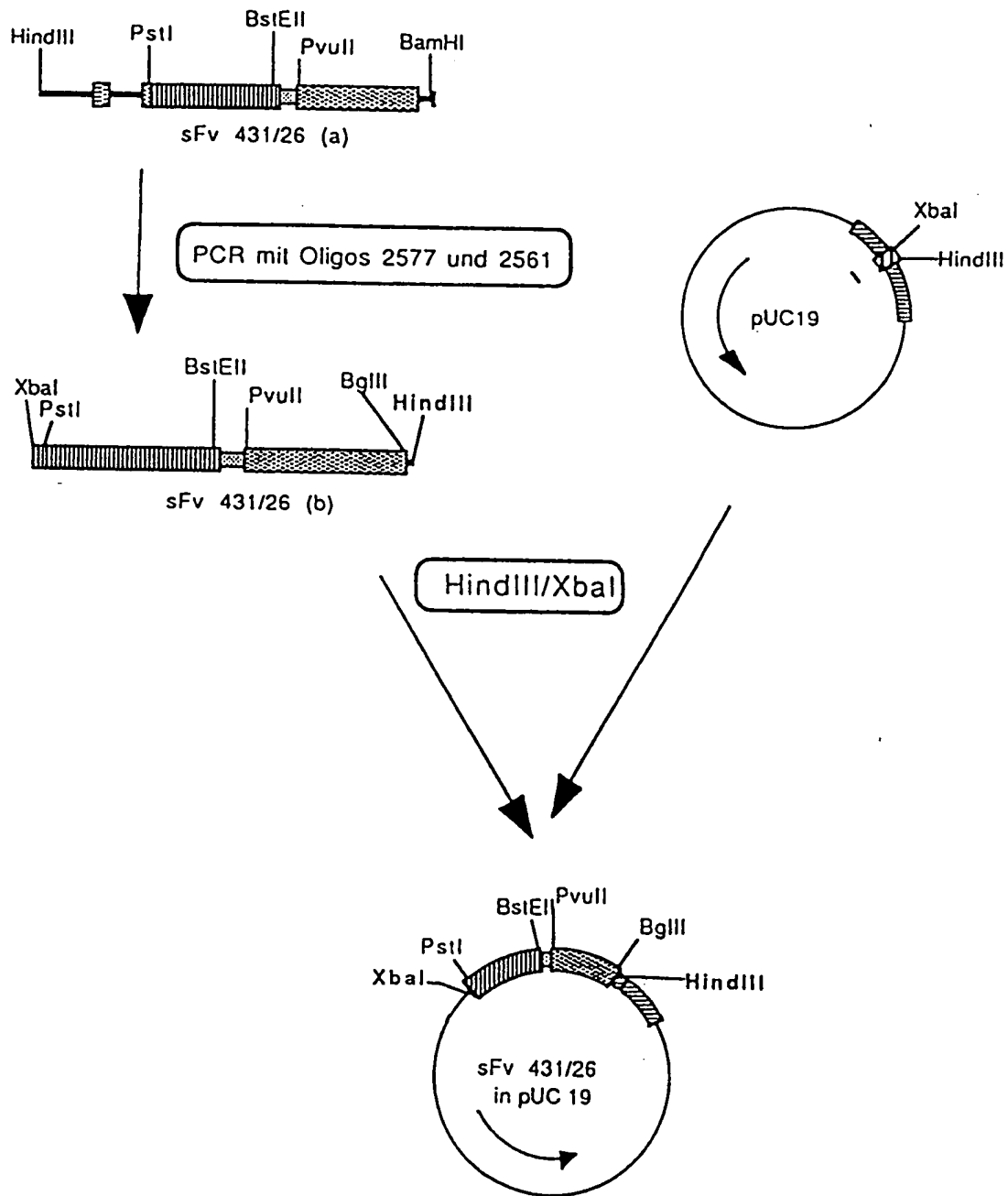


Abb.: 3

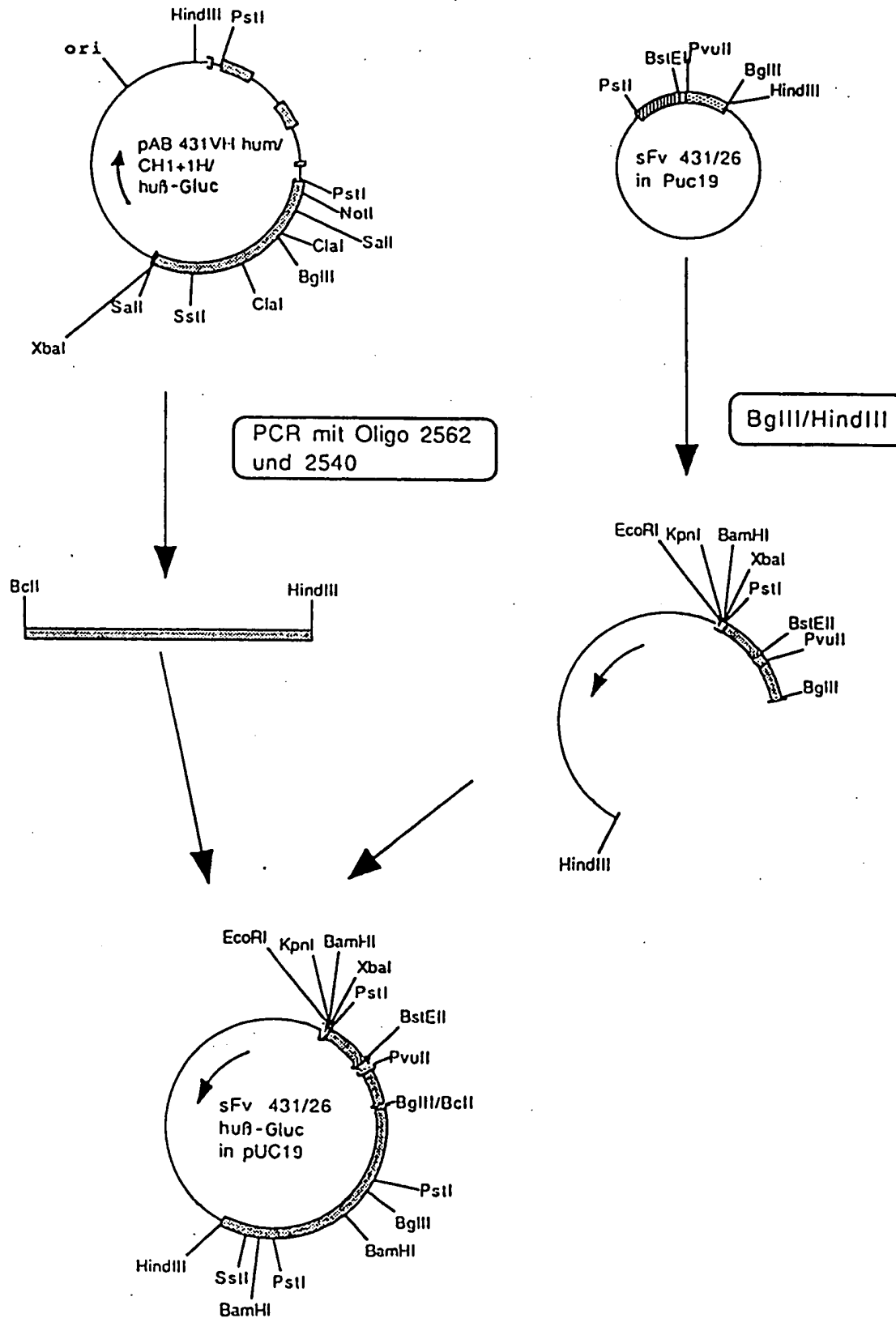


Abb.: 4

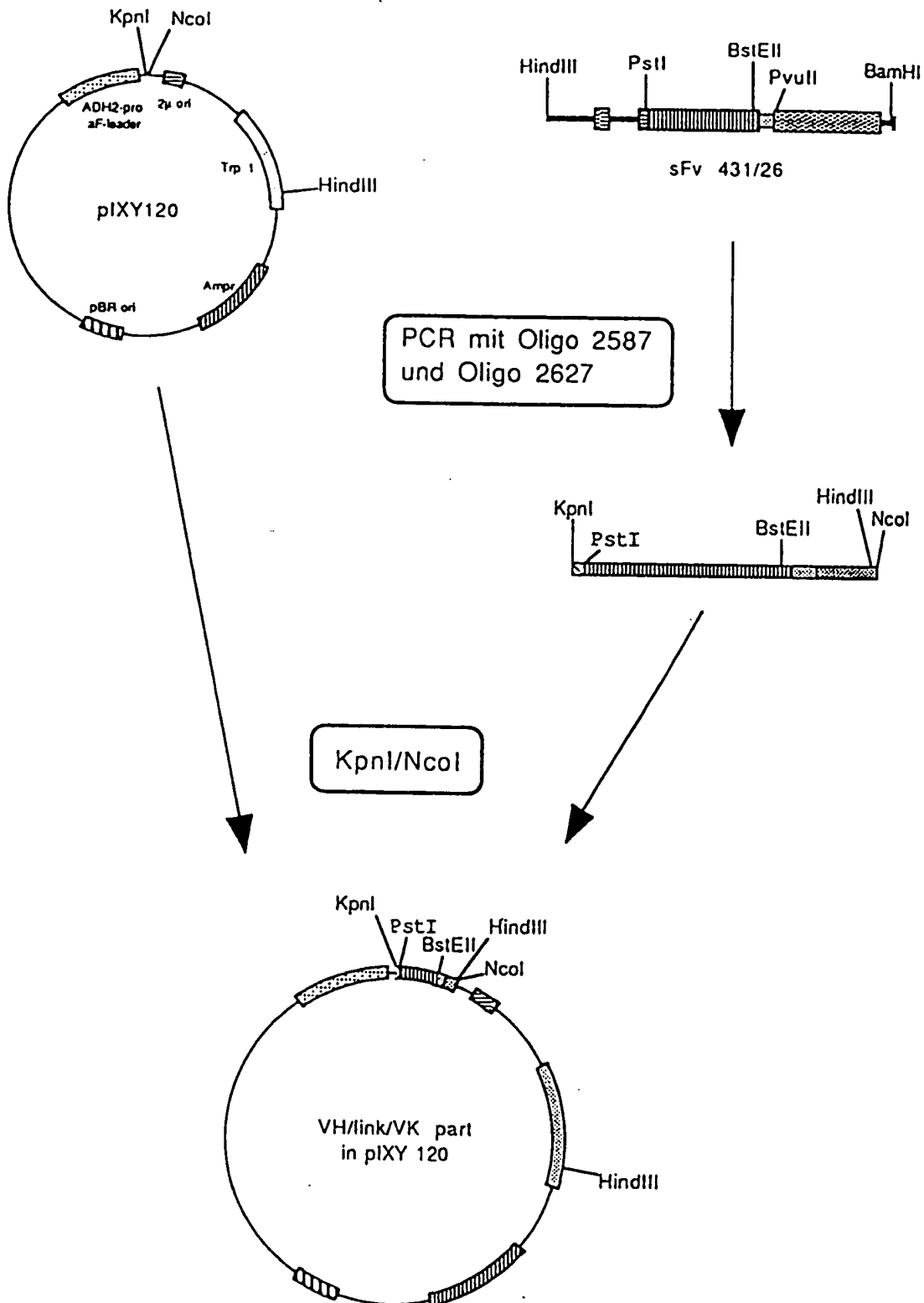


Abb.: 5

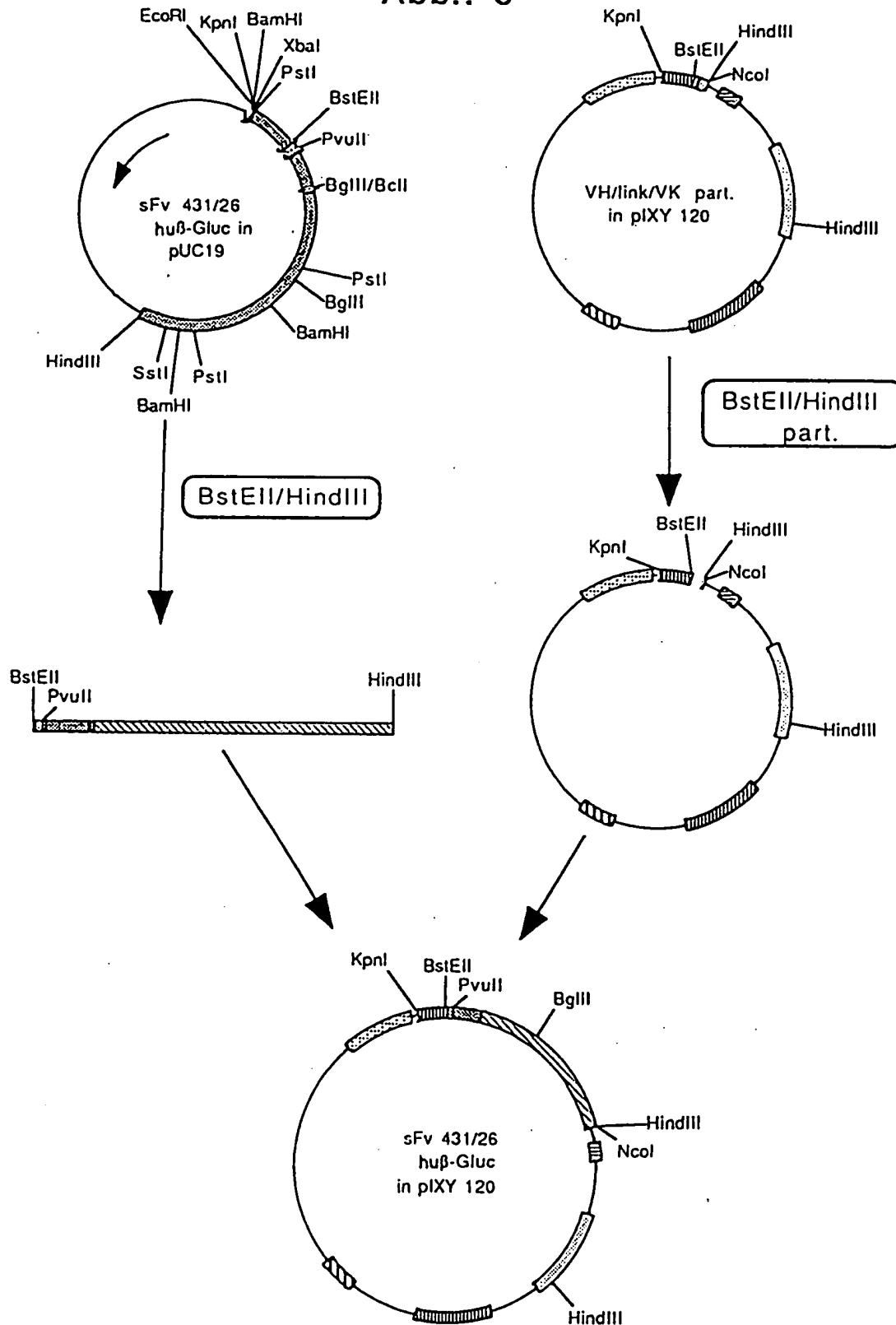


Abb.: 6

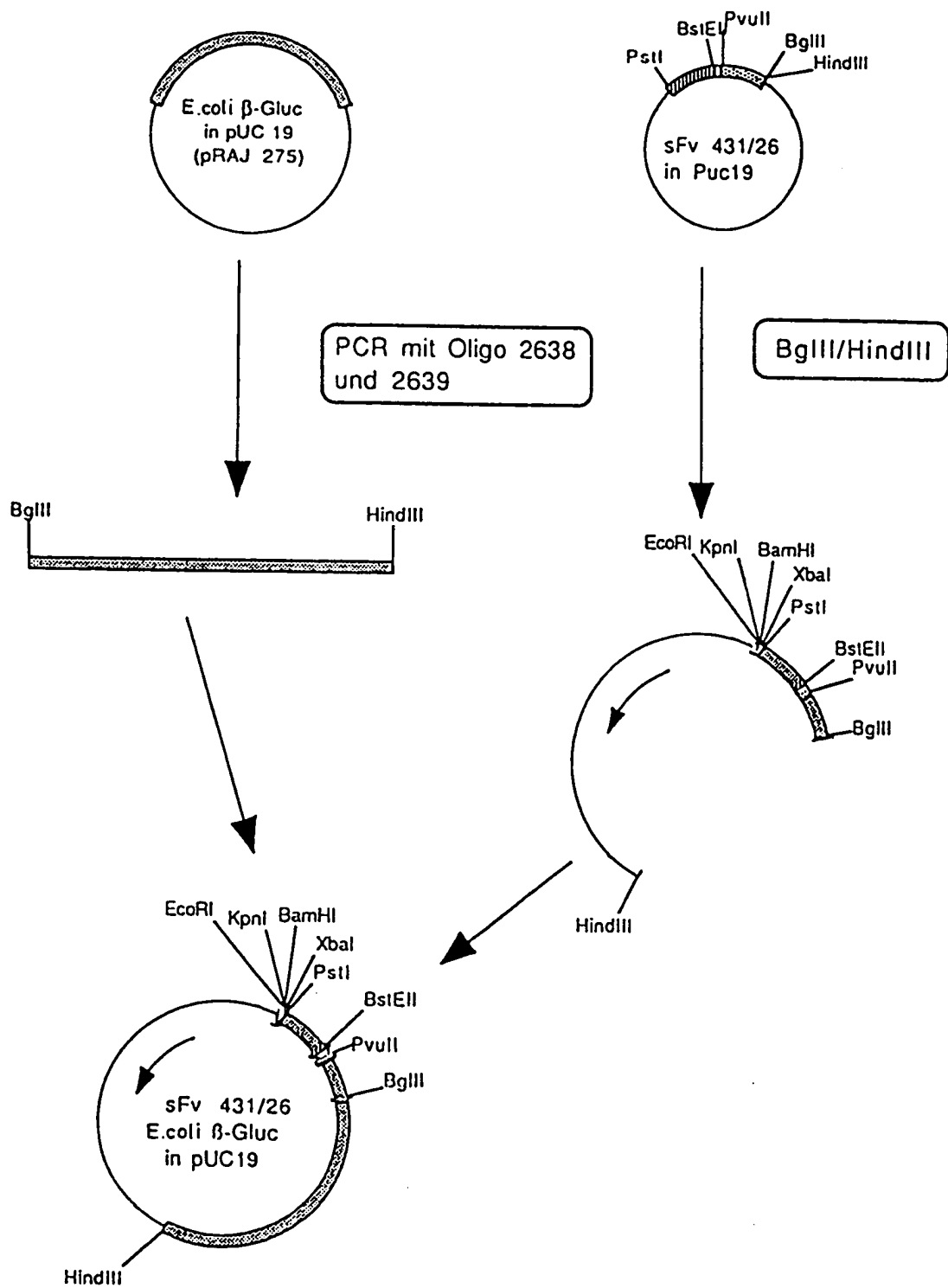


Abb.: 7

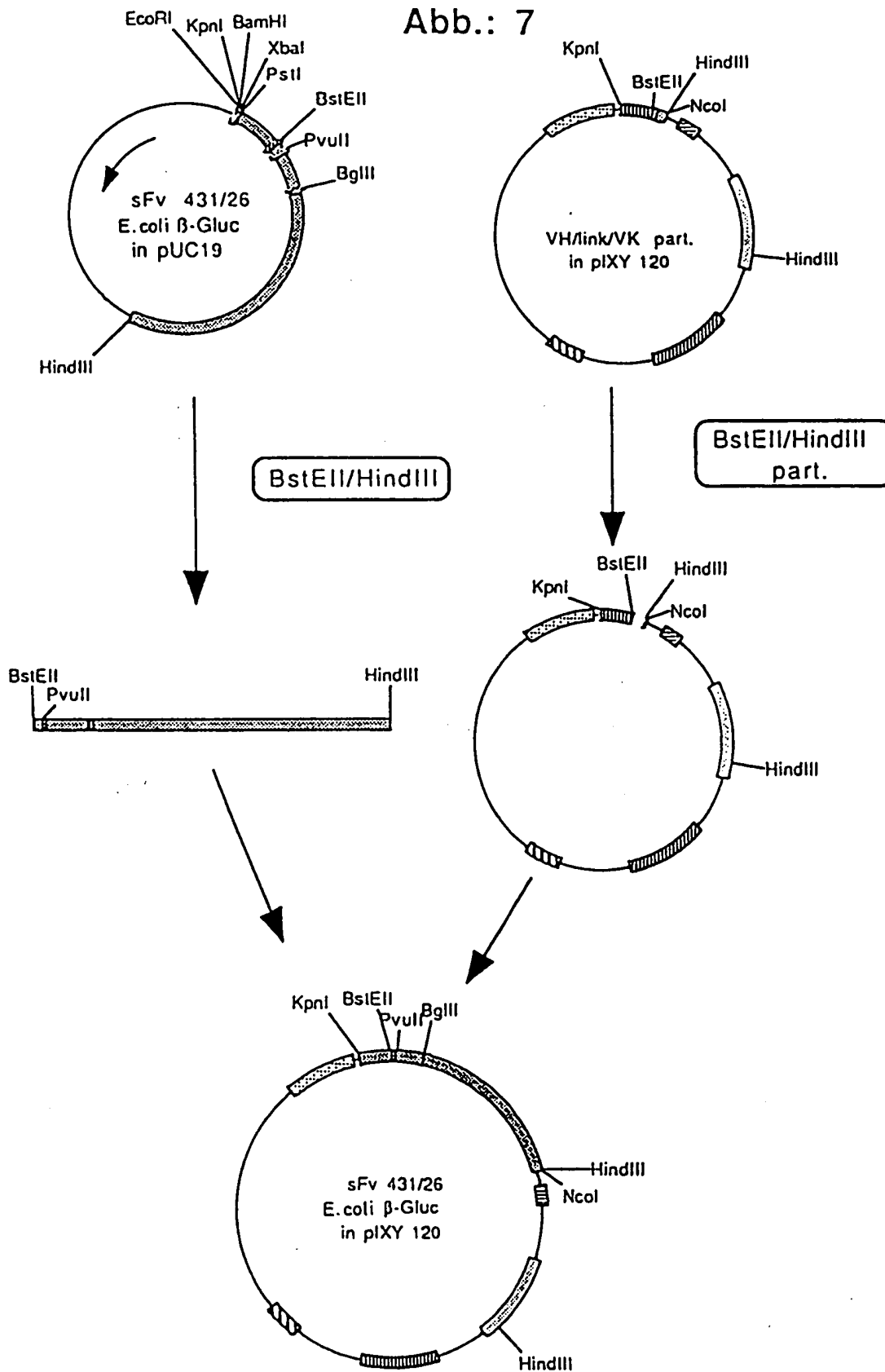


Abb.: 8

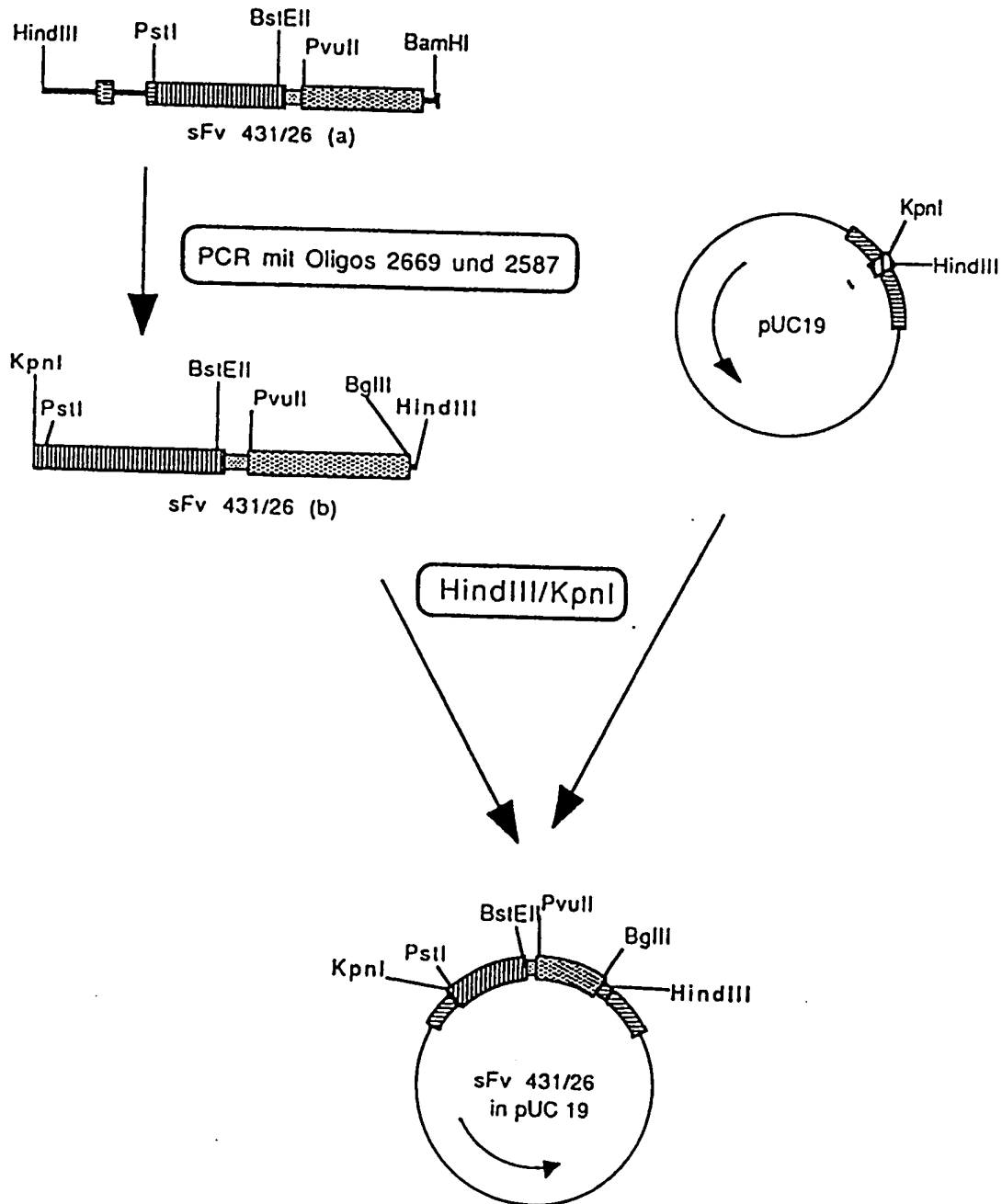


Abb.: 9

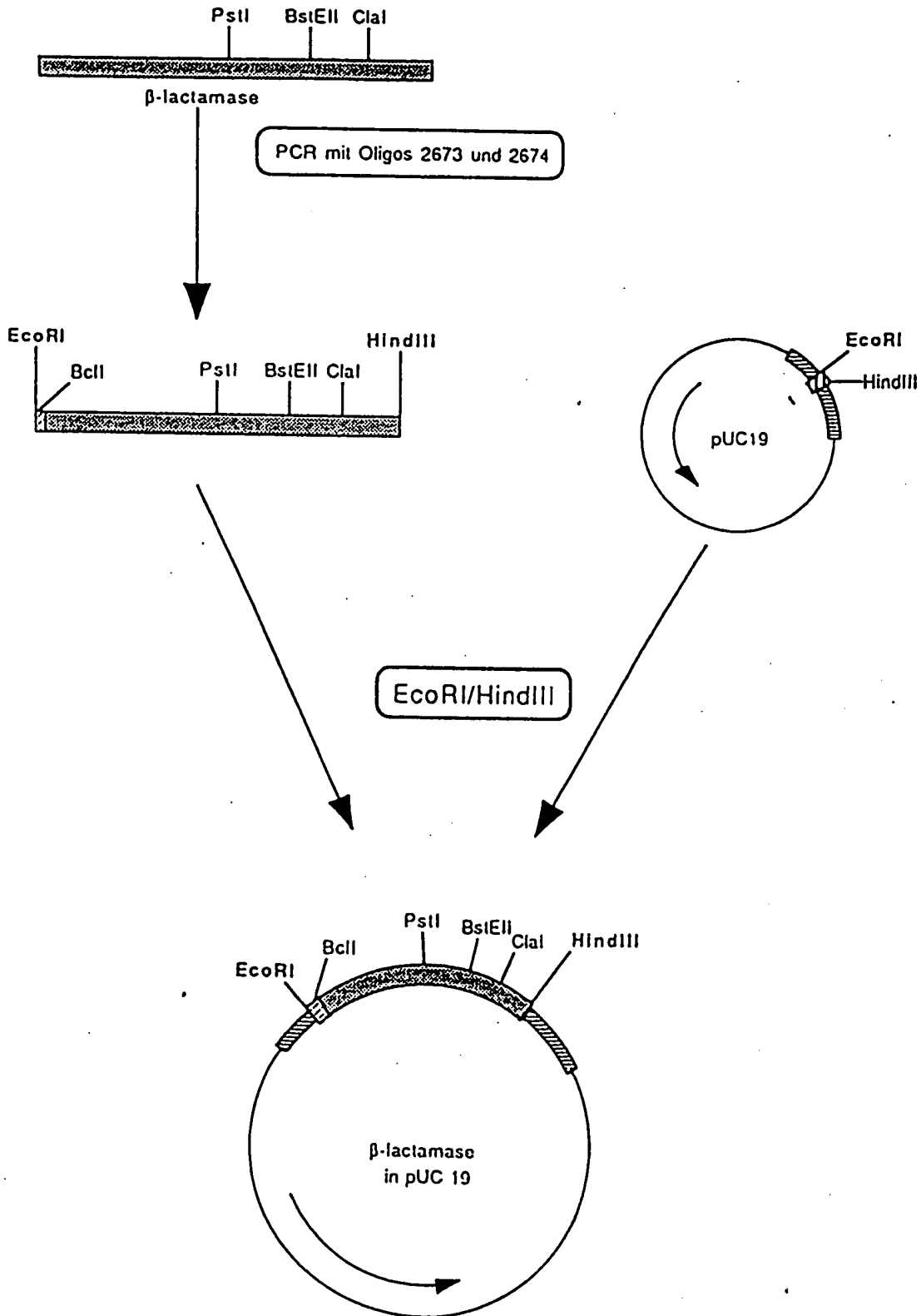


Abb.: 10

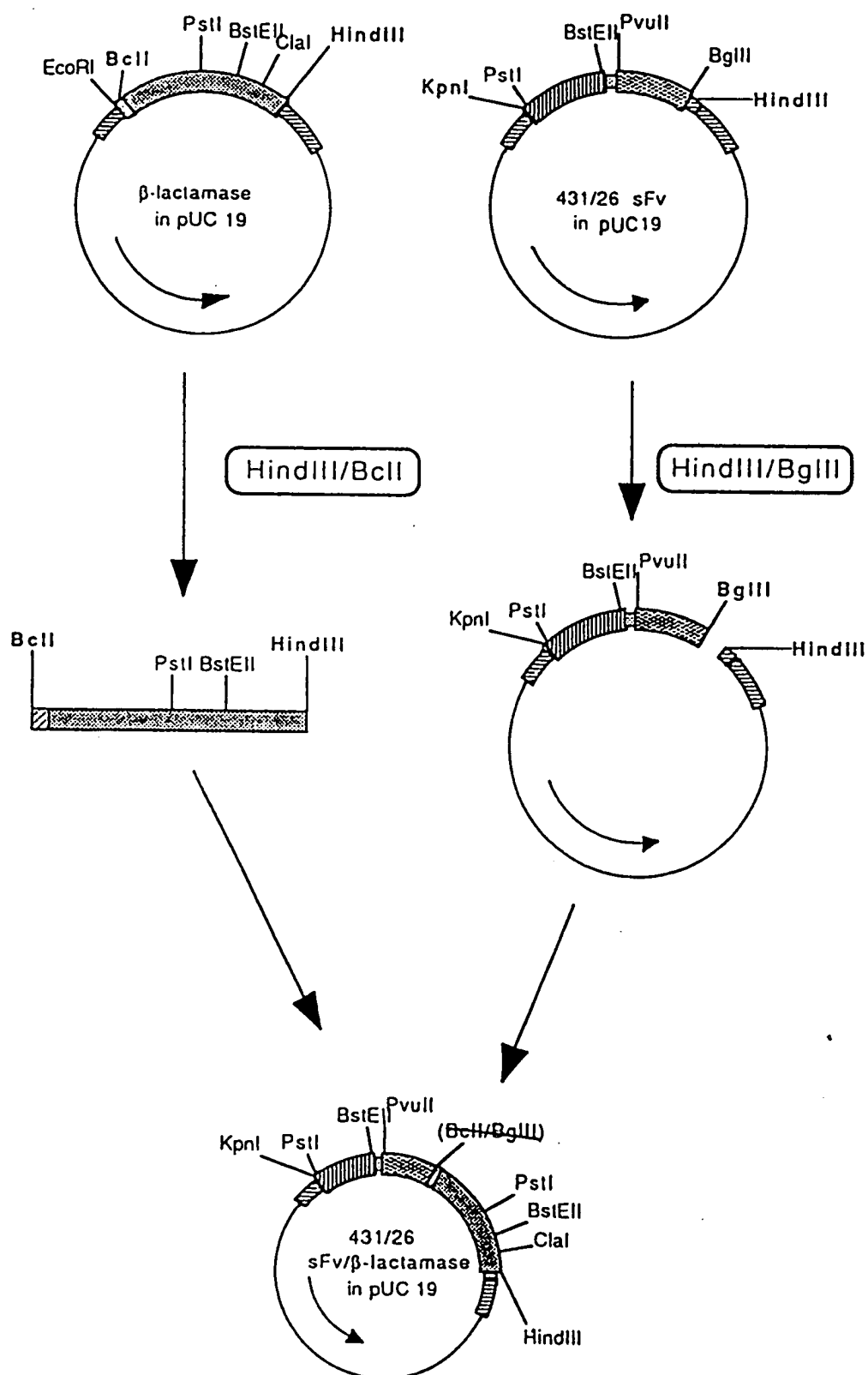
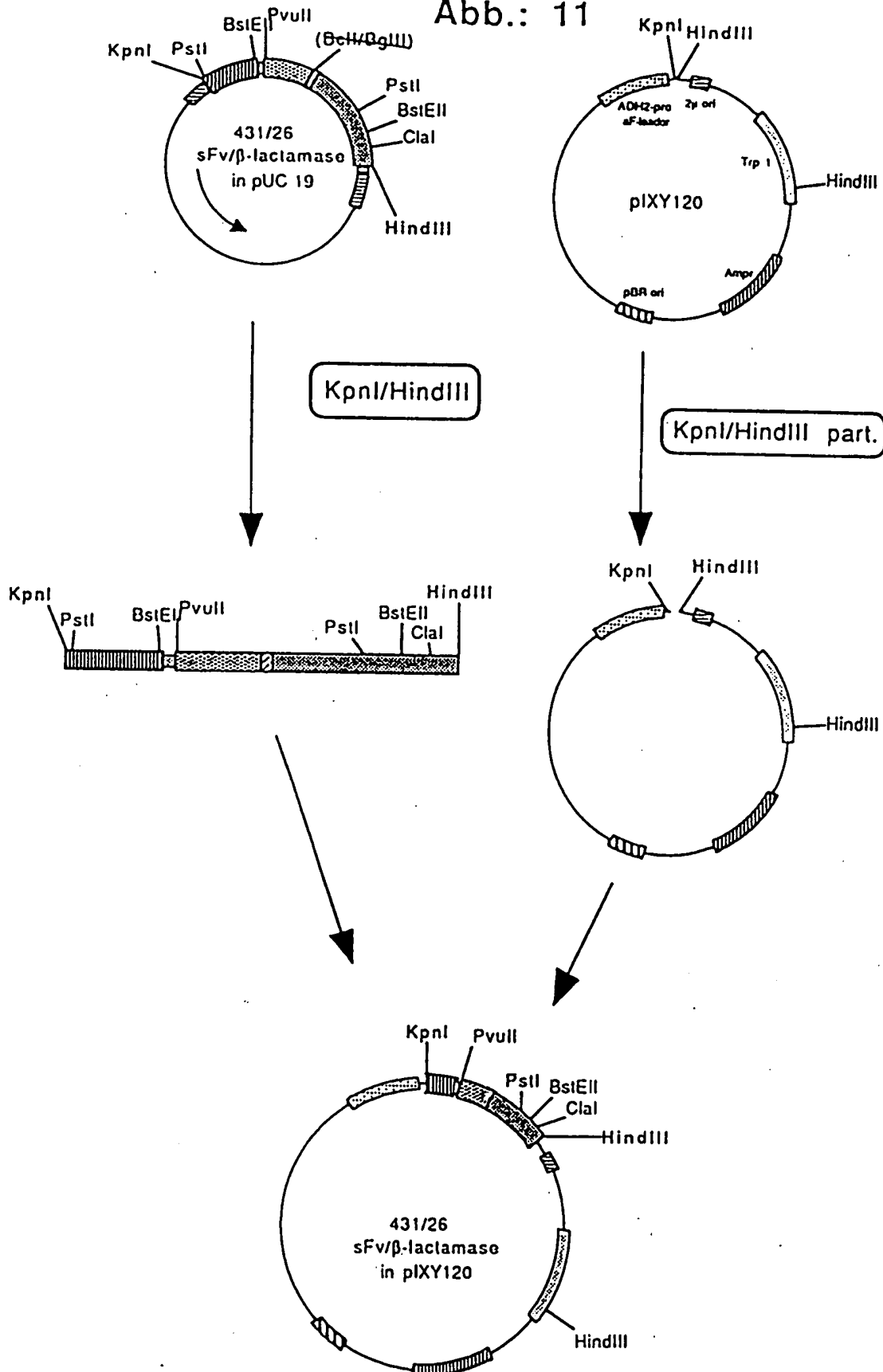


Abb.: 11



THIS PAGE BLANK (USPTO)